

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 588**

51 Int. Cl.:

C12N 9/26 (2006.01)

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 47/61 (2007.01)

A61K 47/64 (2007.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2009 E 15200797 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3037529**

54 Título: **Polipéptidos de PH20 soluble extendida y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.12.2008 US 201384 P

13.11.2009 US 281240 P

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

12.09.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WEI, GE;
PANNEERSELVAM, KRISHNASAMY;
FROST, GREGORY I. y
BOOKBINDER, LOUIS**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 724 588 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

Polipéptidos de PH20 soluble extendida y usos de los mismos

5 Campo de invención

Se proporcionan polipéptidos de PH20 soluble, incluyendo polipéptidos de PH20 soluble extendida, y usos de los mismos. También se proporcionan otros polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal y polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados y usos de los mismos.

10

Antecedentes

El hialuronano (ácido hialurónico; HA) es un polipéptido que se encuentra en la matriz extracelular de muchas células, especialmente en tejidos conjuntivos blandos. También se encuentra HA predominantemente en la piel, el cartílago y en el líquido sinovial en mamíferos. El hialuronano es el constituyente principal del humor vítreo del ojo. El HA tiene un papel en diversos procesos fisiológicos, tal como en la homeostasis de proteínas plasmática y agua (Laurent TC *et al* (1992) FASEB J 6: 2397-2404). Determinadas enfermedades están asociadas con la expresión y/o producción de hialuronano. Las hialuronidasas son enzimas que degradan el hialuronano. Al catalizar HA, las hialuronidasas pueden usarse para tratar enfermedades o trastornos asociados con la acumulación de HA u otros glicosaminoglicanos. Además, puesto que el HA es un componente principal de la barrera intersticial, la hialuronidasa aumenta la permeabilidad tisular y por tanto puede usarse para aumentar la dispersión y administración de agentes terapéuticos. Se han usado terapéuticamente diversas hialuronidasas (por ejemplo Hydase™, Vitrase™ y Wydase™), normalmente como agentes de dispersión y extensión en combinación con otros agentes terapéuticos. Muchas de éstas son formas ovinas o bobinas, que pueden ser inmunogénicas para el tratamiento de humanos. Se necesitan composiciones mejoradas de hialuronidasas que puedan usarse para el tratamiento.

15

20

25

Sumario

30 La presente invención se define en las reivindicaciones, y proporciona una hialuronidasa PH20 soluble extendida (esPH20), en la que:

el polipéptido de esPH20 es activo a pH neutro;

35

el polipéptido de esPH20 es soluble; y

el polipéptido de esPH20 se selecciona de entre:

40

un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta como residuos de aminoácido 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107; o

45

un polipéptido que contiene sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107, mediante lo cual el polipéptido con aminoácidos sustituidos consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la secuencia de aminoácidos correspondiente expuesta como aminoácidos 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107.

Se definen aspectos adicionales de la invención en las reivindicaciones.

50

La siguiente descripción proporciona detalles referentes a tanto realizaciones cubiertas por las reivindicaciones como a la materia no cubierta por las reivindicaciones. La descripción de la materia no cubierta por las reivindicaciones se proporciona sólo como información.

55

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 soluble, incluyendo polipéptidos de PH20 soluble extendida (esPH20), y composiciones. Los polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento son proteínas solubles que están truncadas en el extremo C-terminal e incluyen las que carecen de toda la secuencia señal de unión a anclaje de GPI (por ejemplo están truncadas en las posiciones de aminoácido 450 a 490). Los polipéptidos de PH20 soluble también incluyen polipéptidos de PH20 soluble extendida que conservan uno o más residuos ubicados en la secuencia señal de unión a anclaje de GPI del correspondiente polipéptido de PH20 de tipo natural de longitud completa. También se proporcionan en el presente documento otros polipéptidos de PH20 modificados que contienen truncamientos C-terminales. También se proporcionan formas parcialmente desglicosiladas de cualquiera de los polipéptidos. También se proporcionan métodos de tratamiento usando los polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento.

60

65

Se proporcionan en el presente documento hialuronidasas PH20 solubles extendidas (esPH20) aisladas sustancialmente purificadas, que pueden estar N-glicosiladas o parcialmente N-glicosiladas. En algunos ejemplos, el

polipéptido de esPH20 parcialmente N-glicosilado contiene al menos un resto N-acetilglucosamina unido a cada uno de al menos dos restos unidos a N, tales como, por ejemplo, los residuos de aminoácido 368 y 393 de SEQ ID NO: 107 o los residuos correspondientes a los residuos de aminoácido 368 y 393 de SEQ ID NO: 107. En algunos aspectos, el polipéptido de esPH20 parcialmente N-glicosilado contiene al menos dos restos N-acetilglucosamina unidos a cada uno de al menos dos restos unidos a N. El polipéptido de esPH20 parcialmente N-glicosilado proporcionado en el presente documento también puede contener un azúcar ramificado.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de esPH20 que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 60-63 y 102-104 o una variante alélica o de especie de los mismos. También se proporcionan variantes de polipéptido de esPH20 que tienen una identidad de secuencia de al menos el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% con cualquiera de SEQ ID NO: 60-63 y 102-104 y que conservan al menos el 30% de la actividad hialuronidasa de la correspondiente forma no modificada o de un polipéptido que está codificado por un ácido nucleico que codifica para un polipéptido con los aminoácidos 36-482 de SEQ ID NO: 107. Tales polipéptidos de esPH20 permanecen en forma activa soluble y neutra. En un ejemplo, la esPH20 es una esPH20 humana, tal como una con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 60-63 y 102-104, o una esPH20 de chimpancé, tal como una con una secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497 ó 36-498 de SEQ ID NO: 197.

También se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 sustancialmente purificados. Estos polipéptidos de PH20 pueden tener una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 55-63 y 64-95 o una variante alélica o de especie de la misma. En otros ejemplos, los polipéptidos de PH20 son variantes que tienen una identidad de secuencia de al menos el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% con cualquiera de SEQ ID NO: 55-63 y 64-95, que conservan al menos el 30% de la actividad hialuronidasa de la correspondiente forma no modificada o de un polipéptido que está codificado por un ácido nucleico que codifica para un polipéptido con los aminoácidos 36-482 de SEQ ID NO: 107. Tales polipéptidos de PH20 son formas activas neutras.

Los polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento pueden estar N-glicosilados o parcialmente N-glicosilados. En algunos ejemplos, el polipéptido de esPH20 parcialmente N-glicosilado contiene al menos un resto N-acetilglucosamina unido a cada uno de al menos dos restos unidos a N, tales como, por ejemplo, residuos de aminoácido 368 y 393 de SEQ ID NO: 107 o residuos correspondientes a los residuos de aminoácido 368 y 393 de SEQ ID NO: 107. En algunos aspectos, el polipéptido de PH20 parcialmente N-glicosilado contiene al menos dos restos N-acetilglucosamina unidos a cada uno de al menos dos restos unidos a N. Los polipéptidos de PH20 parcialmente N-glicosilados proporcionados en el presente documento también pueden contener un azúcar ramificado. En algunos aspectos, los polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento son solubles, y pueden seleccionarse de entre PH20 de humano, chimpancé, mono rhesus, mono cynomolgus, ratón, conejo, cobaya, vaca u oveja.

La esPH20 y polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento pueden modificarse, por ejemplo, mediante sialilación, albuminación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación o fosforilación. En algunos aspectos, la esPH20 y polipéptidos de PH20 se modifican mediante un polímero, tal como dextrano o PEG. En el presente documento también se proporcionan conjugados que contienen la esPH20 o polipéptidos de PH20. Los conjugados a modo de ejemplo incluyen aquéllos en los que la esPH20 o PH20 se conjuga con un dominio de multimerización (tal como un dominio Fc), una toxina, un fármaco o marcador detectable.

Se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos que codifican para la esPH20 y polipéptidos de PH20 descritos anteriormente y proporcionados en el presente documento. Estos ácidos nucleicos incluyen los que codifican para una esPH20 o polipéptido de PH20 con aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 36-450, 36-451, 36-452, 36-453, 36-454, 36-455, 36-456, 36-457, 36-458, 36-459, 36-460, 36-461, 36-462, 36-463, 36-464, 36-465, 36-484, 36-485, 36-486, 36-487, 36-489, 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 ó 36-497 de SEQ ID NO: 107, y los que codifican para una esPH20 con aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497 ó 36-498 de SEQ ID NO: 197. También se proporcionan en el presente documento vectores que contienen estos ácidos nucleicos y células que contienen los vectores, tales como células CHO.

Se proporcionan en el presente documento composiciones que contienen una cualquiera o más de la esPH20 o polipéptidos de PH20 descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, las composiciones contienen una pluralidad de esPH20 o polipéptidos de PH20. Por ejemplo, las composiciones pueden contener una pluralidad de polipéptidos de esPH20 que están codificados por una molécula de ácido nucleico que codifica para los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 36-450, 36-451, 36-452, 36-453, 36-454, 36-455, 36-456, 36-457, 36-458, 36-459, 36-460, 36-461, 36-462, 36-463, 36-464, 36-465, 36-484, 36-485, 36-486, 36-487, 36-489, 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 ó 36-497 de SEQ ID NO: 107, y los que codifican para una esPH20 con aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497 ó 36-498 de SEQ ID NO: 197. En algunos ejemplos, las composiciones contienen esPH20 o polipéptidos de PH20 que se secretan de células CHO.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden ser composiciones farmacéuticas. En algunos ejemplos, las composiciones contienen un agente terapéutico adicional, que puede formularse con la composición o en una composición separada. Agentes terapéuticos a modo de ejemplo que pueden incluirse en las composiciones proporcionadas en el presente documento son agentes quimioterápicos, agentes analgésicos, agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos, agentes amebicidas, agentes tricomonocidas, agentes antiparkinsonianos, agentes antipalúdicos, agentes anticonvulsivos, agentes antidepresivos, agentes antiartríticos, agentes antifúngicos, agentes antihipertensivos, agentes antipiréticos, agentes antiparasitarios, agentes antihistamínicos, agentes agonistas alfa-adrenérgicos, agentes alfabloqueantes, agentes anestésicos, agentes broncodilatadores, agentes biocidas, agentes bactericidas, agentes bacteriostáticos, agentes bloqueantes beta-adrenérgicos, agentes bloqueantes de canales de calcio, agentes farmacológicos cardiovasculares, agentes anticonceptivos, agentes descongestivos, agentes diuréticos, agentes depresores, agentes de diagnóstico, agentes de electrolitos, agentes hipnóticos, agentes hormonales, agentes hiperglucémicos, agentes relajantes musculares, agentes contractores musculares, agentes oftálmicos, agentes parasimpatomiméticos, agentes energizantes psíquicos, agentes sedantes, agentes simpatomiméticos, agentes tranquilizantes, agentes urinarios, agentes vaginales, agentes viricidas, agentes de vitaminas, agentes antiinflamatorios no esteroideos, agentes inhibidores de enzima convertidora de angiotensina, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, moléculas orgánicas e inductores del sueño. En ejemplos particulares, el agente terapéutico es un anticuerpo, una inmunoglobulina, un bisfosfonato (tal como ácido zolentrónico), una citocina, un agente quimioterápico o una insulina (tal como una insulina de acción rápida).

Otros agentes terapéuticos que pueden incluirse en las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, acivicinas; aclarubicinas; acodazoles; acroninas; adozelesinas; aldesleucinas; alemtuzumabs; alitretinoínas (ácidos 9-cis-retinoicos); alopurinoles; altretaminas; alvocidibs; ambazonas; ambomicinas; ametantronas; amifostinas; aminoglutetimidias; amsacinas; anastrozoles; anaxironas; ancitabinas; antramincinas; apaziquonas; argimesnas; trióxidos arsénicos; asparaginasas; asperlinas; atrimustinas; azacitidinas; azetepas; azotomicinas; banoxantronas; batabulinas; batimastats; BCG vivo; benaxibinas; bendamustinas; benzodepas; bexaroteno; bevacizumab; bicalutamidas; bietaserpinas; biricodars; bisantrenos; bisantrenos; dimesilatos de bisnafida; bizelesinas; bleomicinas; bortezomibs; brequinaras; bropiriminas; budotitanos; busulfanos; cactinomicinas; calusteronas; canertinibs; capecitabinas; caracemidas; carbetímeros; carboplatinos; carboquonas; carmofurs; carmustinas con polifeprosanos; carmustinas; carubicinas; carzelesinas; cedefingoles; celecoxibs; cemadotinas; clorambucilos; cioteronels; cirolemicinas; cisplatinos; cladribinas; clanfenurs; clofarabinas; crisnatoles; ciclofosfamidias; citarabinas liposomales; citarabinas; dacarbazinas; dactinomicinas; darbeopetinas alfa; daunorubicinas liposomales; daunorubicinas/daunomicinas; daunorubicinas; decitabinas; denileucinas diftiox; dexniguldipinas; dexonnaplatinos; dexrazoxanos; dezaguaninas; diaziquonas; dibrospidios; dienogests; dinalinas; disermolidas; docetaxeles; dofequidars; doxiluridinas; doxorubicinas liposomales; doxorubicina HCl; inyección de liposomas de docorubicina HCl; doxorubicinas; droloxifenos; propionatos de dromostanolona; duazomicinas; ecomustinas; edatrexatos; edotecarinas; eflornitinas; elacridars; elinafidias; disoluciones B de Elliot; elsamitruccinas; emitefurs; enloplatinos; enpromatos; enzastaurinas; epiropidinas; epiubicinas; epoetinas alfa; eptaloprosts; erbulozoles; esorubicinas; estramustinas; etanidazoles; etoglúcidos; fosfatos de etopósido; etopósidos VP-16; etopósidos; etoprinas; exemestanos; exisulinds; fadrozoles; fazarabinas; fenretinidas; filgrastims; floxuridinas; fludarabinas; fluorouracilos; 5-fluorouracilos; fluoximesteronas; fluocitabinas; fosquidonas; fostriecinas; fostriecinas; fotretaminas; fulvestrants; galarubicinas; galocitabinas; gemcitabinas; gemtuzumabs/ozogamicinas; geroquinoles; gimatecanos; gimeracilos; gloxazonas; glufosfamidias; acetatos de goserelina; hidroxixureas; ibritumomabs/tixetanas; idarubicinas; ifosfamidias; ilmofofinas; ilomastats; mesilatos de imatinib; imexonas; improsulfanos; indisulams; inproquonas; interferones alfa-2a; interferones alfa-2b; interferones alfa; interferones beta; interferones gamma; interferones; interleucinas-2 y otras interleucinas (incluyendo interleucinas recombinantes); intoplicinas; lobenguanos [131-I]; iroplatinos; irinotecanos; irsogladinas; ixabepilonas; ketotrexatos; l-alanosinas; lanreotidas; lapatinibs; ledoxantronas; letrozoles; leucovorinas; leuprolidas; leuprorelinas (leuprorelidas); levamisoles; lexacalcitoles; liarozoles; lobaplatinos; lometrexoles; lomustinas/CCNU; lomustinas; lonafarnibs; losoxantronas; lurtotecanos; mafosfamidias; manosulfanos; marimastats; masoprocoles; maitansinas; mecloretaminas; mecloretaminas/mostazas de nitrógeno; acetatos de megestrol; megestroles; melengestroles; melfalanos; melfalanos L-PAM; menogarilos; mepitiostanos; mercaptopurinas; 6-mercaptopurina mesnas; metesinds; metotrexatos; metoxsalenos; metomidatos; metoprinas; meturedepas; miboplatinos; miproxifenos; misonidazoles; mitindomidias; mitocarcinas; mitocrominas; mitoflaxonas; mitogilinas; mitoguzonas; mitomalquinas; mitomicinas C; mitomicinas; mitonafidas; mitoquidonas; mitospers; mitotanos; mitoxantronas; mitozolomidias; mivobulinas; mizoribinas; mofaroteno; mopidamoles; mubritinibs; ácidos micofenólicos; fenpropionatos de nandrolona; nedaplatinos; nelzarabinas; nemorubicinas; nitracinas; nocodazoles; nofetumomabs; nogalamicinas; nolatrexeds; nortopixantronas; oprelvekinas; ormaplatinos; ortataxeles; oteracilos; oxaliplatinos; oxisuranos; oxofenarsinas; paclitaxeles; pamidronatos; patubilonas; pegademazas; pegaspargasas; pegfilgrastims; peldesinas; peliomycinas; pelitrexoles; pemetrexeds; pentamustinas; pentostatinas; peplomicinas; perfosfamidias; perifosinas; picoplatinos; pinafidias; pipobromanos; piposulfanos; pirfenidonas; piroxantronas; pixantronas; plevitrexeds; mitramycinas plicamicidas; plicamicinas; plomestanos; plomestanos; porfímeros sódicos; porfímeros; porfiromicinas; prednimustinas; procarbazinas; propamidinas; prospidios; pumitepas; puromycinas; pirazofurinas; quinacinas; ranimustinas; rasburicasas; riboprinas; ritrosulfanos; rituximabs; rogletimidas; roquimimexs; rufocromomicinas; sabarubicinas; safingoles; sargramostims; satraplatinos; sebriplatinos; semustinas; simtrazenos; sizofiranos; sobuzoxanos; sorafenibs; esparfosatos; ácidos esparfósicos; esparfomicinas; espirogermanios; espiromustinas; espiroplatinos; espiroplatinos; esculaminas;

estreptonigrinas; estreptovaricinas; estreptozocinas; sufosfamidas; sulofenurs; malato de sunitinib; 6-TG; tacedinalinas; talcos; talisomicinas; talimustinas; tamoxifenos; tariquidars; tauromustinas; tecogalanos; tegafurs; teloxantronas; temoporfinas; temozolomidas; tenipósidos/VM-26; tenipósidos; teroxironas; testolactonas; tiamiprinas; tioguaninas; tiotepas; tiamiprinas; tiazofurinas; tilomisoles; tiloronas; timcodars; timonacics; tirapazaminas; topixantronas; topotecanos; toremifenos; tositumomabs; trabectedinas (ecteinascidina 743); trastuzumabs; trestolonas; tretinoínas/ATRA; tricirbinas; trilostanos; trimetrexatos; tetranitratos de triplatino; triptorelinas; trofosfamidas; tubulozoles; ubenimexs; mostazas de uracilo; uredepas; valrubicinas; valspodars; vapreotidas; verteporfinas; vinblastinas; vincristinas; vindesinas; vinepidinas; vinfluninas; vinformidas; vinglicinatos; vinleucinoles; vinleurosinas; vinorelbinas; vinrosidinas; vintriptoles; vinzolidinas; vorozoles; xantomycinas A (guameciclinas); zeniplatinos; zilascorbs [2-H]; zinostatinas; zoledronato; zorubicinas; y zosuquidars.

Se proporcionan en el presente documento métodos para tratar una enfermedad o un estado asociado con hialuronano, en el que se administra a un sujeto una esPH20 o PH20, o una composición que contiene una esPH20 o PH20, proporcionada y descrita en el presente documento. También se proporcionan métodos para tratar un exceso de glicosaminoglicanos; para tratar un tumor; para tratar la acumulación de glicosaminoglicano en el cerebro; para tratar un trastorno cardiovascular; para tratar un trastorno oftálmico; una tratar una enfermedad pulmonar; para aumentar la penetración de agentes quimioterápicos dentro de tumores sólidos; para tratar la celulitis; o para aumentar la biodisponibilidad de fármacos y otros agentes terapéuticos. Tales métodos implican administrar a un sujeto cualquiera de la esPH20 o polipéptidos de PH20 o composiciones descritas en el presente documento.

La esPH20 y polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento pueden usarse en lugar de una hialuronidasa PH20, solos o en combinación, en cualquier método de tratamiento o terapia de combinación para la que se usa una hialuronidasa PH20 en las publicaciones estadounidenses n.^{os} US20040268425, US20050260186 y US20060104968; y las solicitudes estadounidenses con n.^{os} de serie 12/381.844, 12/386.249, 12/387.225 y 12/386.222.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa una alineación de la secuencia de aminoácidos de polipéptidos de PH20 de humano (SEQ ID NO: 107) y chimpancé (SEQ ID NO: 197) (realizada usando el programa de alineación ClustalW2). Los residuos de aminoácido de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI de PH20 humana, y los correspondientes aminoácidos en la secuencia de PH20 de chimpancé, están en negrita y subrayados. “**” indica que los residuos por encima son idénticos en ambas secuencias en la alineación. “:” indica sustituciones conservadas, y “.” indica sustituciones semiconservadas.

La figura 2 representa los tipos principales de N-glicanos en vertebrados, incluyendo glicanos con alto contenido en manosa, glicanos híbridos y glicanos complejos.

La figura 3 representa los sitios de escisión de endoglicosidasa. La figura 3A ilustra los sitios de escisión para endoglicosidasa F1 y péptido N glicosidasa F (PNGasaF). La figura 3B ilustra los sitios de escisión para endoglicosidasa F2 y PNGasaF. La figura 3C ilustra los sitios de escisión para endoglicosidasa F3 y PNGasaF. La figura 3D ilustra los sitios de escisión para endoglicosidasa F4 y PNGasaF.

Descripción detallada

Visión general

A. Definiciones

B. Visión general

1. PH20

a. Glicosilación

b. Anclaje de GPI

C. Polipéptidos de PH20 soluble extendida

1. Polipéptidos de esPH20 humanos

2. Polipéptidos de esPH20 de otras especies

D. Polipéptidos de PH20 parcialmente N-glicosilados

1. Polipéptidos de PH20

2. Polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal

3. Modificaciones adicionales

Conjugación con polímeros

5 E. Métodos de producción de ácidos nucleicos que codifican para PH20 soluble extendida y otras hialuronidasas PH20 solubles, y polipéptidos de las mismas

10 1. Vectores y células

2. Expresión

a. Células procariotas

15 b. Células de levadura

c. Células de insecto

20 d. Células de mamífero

e. Plantas

3. Técnicas de purificación

25 F. Preparación, formulación y administración de Polipéptidos de PH20 soluble extendida, y otros polipéptidos de PH20 soluble

1. Inyectables, disoluciones y emulsiones
Polvos liofilizados

30 2. Administración tópica

3. Composiciones para otras vías de administración

35 4. Dosificación y administración

5. Envasado, artículos de fabricación y kits

G. Ensayos

40 1. Actividad hialuronidasa

2. Solubilidad

45 H. Métodos de Tratamiento y usos de PH20 soluble extendida y otra PH20 soluble y terapia de combinación

1. Uso como agente de extensión y terapia de combinación

50 2. Uso para eliminar glicosaminoglicanasas en exceso

a. Uso en el tratamiento de cáncer

b. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicano en el cerebro

55 c. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicano en enfermedad cardiovascular

d. Uso en vitrectomía y trastornos y estados oftálmicos

e. Uso en hipodermocclisis

60 f. Uso en terapia génica

g. Usos cosméticos

65 h. Uso en trasplante de órganos

i. Uso en enfermedad pulmonar

3. Otros usos

5 I. Ejemplos

A. Definiciones

10 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la(s) invención/inventiones.

15 En el caso en el que haya una pluralidad de definiciones para términos en el presente documento, prevalecen las de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de este tipo, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y la información particular en Internet puede ir y venir, pero puede encontrarse información equivalente buscando en Internet. La referencia a la misma demuestra la disponibilidad y diseminación pública de tal información.

20 Tal como se usa en el presente documento, hialuronidasa se refiere a una clase de enzimas que degradan 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 sin limitarse a, murina, canina, felina, leporina, aviar, bovina, ovina, porcina, equina, de peces, de ranas, bacteriana, y cualquier forma de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas humanas a modo de ejemplo incluyen HYL1, HYL2, HYL3, HYL4 y PH20 (SEQ ID NO: 107). También se incluyen entre las hialuronidasas solubles, 25 incluyendo, PH20 ovina y bovina, PH20 humana soluble y rHuPH20. Ejemplos de hialuronidasas solubles bovinas u ovinas disponibles comercialmente son hialuronidasa Vitrase® (hialuronidasa ovina) y hialuronidasa Amphadase® (hialuronidasa bovina).

30 Tal como se usa en el presente documento, PH20 se refiere a un tipo de hialuronidasa que aparece en el espermatozoide y es una forma activa neutra. PH-20 aparece sobre la superficie del espermatozoide, y en el acrosoma derivado de lisosomas, donde se une a la membrana acrosómica interna. PH20 incluye las de cualquier origen incluyendo, pero sin limitarse a, origen de humano, chimpancé, mono cynomolgus, mono rhesus, murino, bovino, ovino, de cobaya, de conejo y de rata. Los polipéptidos de PH20 a modo de ejemplo incluyen los de humano (SEQ ID NO: 107), chimpancé (SEQ ID NO: 197), mono rhesus (SEQ ID NO: 198), mono cynomolgus (SEQ ID NO: 35 114), vaca (por ejemplo, SEQ ID NO: 111 y 119); ratón (SEQ ID NO: 117); rata (SEQ ID NO: 116); conejo (SEQ ID NO: 112); oveja (SEQ ID NO: 113, 118 y 120) y cobaya (SEQ ID NO: 115). La referencia a PH20 incluye polipéptidos de PH20 precursores y polipéptidos de PH20 maduros (tales como aquéllos en los que se ha eliminado una secuencia señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que 40 tienen una identidad de secuencia de al menos el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con los polipéptidos precursores expuestos en SEQ ID NO: 107 y 109, o las formas maduras de los mismos. Los polipéptidos de PH20 también incluyen los que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y los que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. 45 Tales 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 C-terminal de la misma, particularmente formas que están truncadas y son activas neutras cuando están N-glicosiladas.

50 Tal como se usa en el presente documento, una PH20 soluble se refiere a cualquier forma de PH20 se sea soluble en condiciones fisiológicas. Una PH20 soluble puede identificarse, por ejemplo, por su reparto en la fase acuosa de una disolución de Triton® X-114 a 37°C (Bordier *et al.*, (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7). PH20 anclada a la membrana, tal como PH20 anclada a lípidos, incluyendo PH20 anclada a GPI, se repartirá en la fase rica en detergente, pero se repartirá en la fase acuosa o pobre en detergente tras el tratamiento con fosfolipasa-C. Se 55 incluyen entre PH20 soluble PH20 anclada a la membrana en la que una o más regiones asociadas con el anclaje de la PH20 a la membrana se ha retirado o modificado, en donde la forma soluble conserva la actividad hialuronidasa. PH20 soluble también incluye 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. A modo de ejemplo de tal PH20 soluble es PH20 humana soluble.

60 Tal como se usa en el presente documento, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluye polipéptidos de PH20 que carecen de toda o una parte de la secuencia de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C-terminal de manera que tras la expresión, los polipéptidos son solubles en condiciones fisiológicas. La solubilidad puede evaluarse mediante cualquier método adecuado que demuestre solubilidad en condiciones fisiológicas. A modo de 65 ejemplo de tales métodos es el ensayo de Triton® X-114, que evalúa el reparto en la fase acuosa y que se describió anteriormente y en los ejemplos. Además, un polipéptido de PH20 humana soluble, si se produce en células CHO,

tales como células CHO-S, es un polipéptido que se expresa y se secreta al medio de cultivo celular. Sin embargo, los polipéptidos de PH20 humana soluble no se limitan a los producidos en células CHO, sino que pueden producirse en cualquier célula o mediante cualquier método, incluyendo expresión recombinante y síntesis de polipéptidos. La referencia a la secreción en células CHO es definitoria. Por tanto, si un polipéptido pudiera expresarse y secretarse en células CHO y es soluble, es decir se reparte en la fase acuosa cuando se extrae con Triton® X-114, es un polipéptido de PH20 soluble ya se produzca o no de ese modo. Los polipéptidos precursores de sHuPH20 pueden incluir una secuencia señal, tal como una secuencia señal heteróloga o no heteróloga (es decir nativa). Precursores a modo de ejemplo son los que incluyen una secuencia señal, tal como la secuencia señal nativa de 35 aminoácidos en las posiciones de aminoácido 1-35 (véase, por ejemplo, los aminoácidos 1-35 de SEQ ID NO: 107).

Tal como se usa en el presente documento, una "PH20 soluble extendida" o "esPH20" incluye polipéptidos de PH20 soluble que contienen residuos hasta la secuencia señal de unión a anclaje de GPI y uno o más residuos contiguos de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI de manera que la esPH20 es soluble en condiciones fisiológicas. La solubilidad en condiciones fisiológicas puede determinarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede someterse a ensayo mediante el ensayo de Triton® X-114 descrito anteriormente y en los ejemplos. Además, tal como se comentó anteriormente, una PH20 soluble, si se produce en células CHO, tales como células CHO-S, es un polipéptido que se expresa y se secreta al medio de cultivo celular. Sin embargo, los polipéptidos de PH20 humana soluble no se limitan a los producidos en células CHO, sino que pueden producirse en cualquier célula o mediante cualquier método, incluyendo expresión recombinante y síntesis de polipéptidos. La referencia a la secreción en células CHO es definitoria. Por tanto, si un polipéptido pudiera expresarse y secretarse en células CHO y es soluble, es decir se reparte en la fase acuosa cuando se extrae con Triton® X-114, es un polipéptido de PH20 soluble ya se produzca o no de ese modo. Los polipéptidos de esPH20 soluble humana incluyen, además de los residuos 36-490, uno o más aminoácidos contiguos a partir de la posición de residuo de aminoácido 491 de SEQ ID NO: 107, incluidos, de manera que el polipéptido resultante es soluble. Polipéptidos solubles de esPH20 humana a modo de ejemplo son los que tienen residuos de aminoácido correspondientes a los aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 y 36-497 de SEQ ID NO: 107. A modo de ejemplo de estos son los que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 60-63 y 102-104. También se incluyen variantes alélicas y otras variantes, tales como cualquiera con una identidad de secuencia del 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o mayor con los correspondientes polipéptidos de SEQ ID NO: 60-63 y 102-104 que conservan actividad neutra y son solubles. La referencia a identidad de secuencia se refiere a variantes con sustituciones de aminoácidos.

Tal como se usa el presente documento, la referencia a esPH20s incluye polipéptidos precursores de esPH20 y polipéptidos maduros de esPH20 (tales como aquellos en los que se ha eliminado una secuencia señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad enzimática (que conservan al menos el 1%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50% o más de la forma de longitud completa) y son solubles, e incluyen variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con los polipéptidos precursores expuestos en SEQ ID NO: 107 y 109, o las formas maduras de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, la referencia a esPH20 también incluye las que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y las que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20) se refiere a una forma soluble de PH20 humana que se expresa de manera recombinante y se secreta en células de ovario de hámster chino (CHO). rHuPH20 soluble está codificada por ácido nucleico que incluye la secuencia señal y se expone en SEQ ID NO: 109. También se incluyen moléculas de ADN que son variantes alélicas de la misma y otras variantes solubles. El ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. Tal como se produce en el medio de cultivo, existe heterogeneidad en el extremo C-terminal de modo que el producto incluye una mezcla de especies que pueden incluir una cualquiera o más de SEQ ID NO: 122 a SEQ ID NO: 127 en abundancia variable.

De manera similar, para otras formas de PH20, tales como la esPH20s, los polipéptidos expresados de manera recombinante y composiciones de los mismos pueden incluir una pluralidad de especies cuyo extremo C-terminal presenta heterogeneidad. Por ejemplo, composiciones de esPH20 expresada de manera recombinante producida mediante la expresión del polipéptido de SEQ ID NO: 8, que codifica para una esPH20 que tiene los aminoácidos 36-497, puede incluir formas con menos aminoácidos, tales como 36-496, 36-495.

Tal como se usa en el presente documento, un resto unido a N se refiere a un residuo de aminoácido asparagina (N) de un polipéptido que puede glicosilarse mediante modificación postraduccional de un polipéptido. Los restos unidos a N a modo de ejemplo de PH20 humana incluyen los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20

humana expuesta en SEQ ID NO: 107.

5 Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido N-glicosilado se refiere a un polipéptido de PH20 o una forma truncada del mismo que contiene un enlace oligosacárido de al menos tres residuos de aminoácido unidos a N, por ejemplo, restos unidos a N correspondientes a los residuos de aminoácido N235, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107. Un polipéptido N-glicosilado puede incluir un polipéptido en el que tres, cuatro, cinco y hasta todos los restos unidos a N se unen a un oligosacárido. Los oligosacáridos unidos a N pueden incluir oligomanosa, oligosacáridos complejos, híbridos o sulfatados, u otros oligosacáridos y monosacáridos.

10 Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido parcialmente N-glicosilado se refiere a un polipéptido que contiene de manera mínima un N-acetilglicosaminaglicano unido a al menos tres restos unidos a N. Un polipéptido parcialmente glicosilado puede incluir diversas formas de glicano, incluyendo monosacáridos, oligosacáridos y formas de azúcar ramificadas, incluyendo las formadas mediante tratamiento de un polipéptido con EndoH, EndoF1, EndoF2 y/o EndoF3. La escisión de glicanos por tales enzimas se representa, por ejemplo, en la figura 2.

15 Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido de PH20 desglicosilado se refiere a un polipéptido de PH20 proporcionado en el presente documento en el que están glicosilados menos de todos los posibles sitios de glicosilación. La desglicosilación puede efectuarse, por ejemplo, eliminando la glicosilación, o impidiéndola, o modificando el polipéptido para eliminar un sitio de glicosilación. Tal como se muestra en el presente documento, no se requieren sitios de N-glicosilación particulares para la actividad, mientras que otros sí.

20 Tal como se usa en el presente documento, una enfermedad, un trastorno o un estado asociado a hialuronano se refiere a cualquier enfermedad o estado en el que los niveles de hialuronano son elevados como causa, consecuencia o se observan de otro modo en la enfermedad o el estado. Las enfermedades y los estados asociados a hialuronano están asociados con expresión de hialuronano elevada en tejido o una célula, aumento de la presión de fluido intersticial, disminución del volumen vascular y/o aumento del contenido en agua en un tejido. Las enfermedades, los trastornos o los estados asociados a hialuronano pueden tratarse mediante la administración de una composición que contiene una enzima que degrada hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una hialuronidasa soluble, o bien sola o bien en combinación con o además de otro tratamiento y/o agente. Las enfermedades y los estados a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cánceres ricos en hialuronano, por ejemplo, tumores, incluyendo tumores sólidos tales como cánceres en estadio tardío, cánceres metastásicos, cánceres no diferenciados, cáncer de ovario, carcinoma in situ (ISC), carcinoma de células escamosas (SCC), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de colon y otros cánceres. También a modo de ejemplo de enfermedades y estados asociados a hialuronano son enfermedades que están asociadas con presión de fluido intersticial elevada, tales como enfermedades asociadas con presión de disco, y edema, por ejemplo, edema provocado por trasplante de órganos, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico u otra lesión. Las enfermedades y los estados asociados a hialuronano a modo de ejemplo incluyen enfermedades y estados asociados con presión de fluido intersticial elevada, disminución del volumen vascular y/o aumento del contenido en agua en un tejido, incluyendo cánceres, presión de disco y edema. En un ejemplo, el tratamiento del estado, la enfermedad o el trastorno asociado a hialuronano incluye mejora, reducción u otro efecto beneficioso sobre uno o más de presión de fluido intersticial aumentada (IFP), disminución del volumen vascular y aumento del contenido en agua en un tejido.

45 Tal como se usa en el presente documento, un conjugado se refiere a polipéptidos de PH20 soluble unidos directa o indirectamente a uno o más otros polipéptidos o restos químicos. Tales conjugados incluyen proteínas de fusión, los producidos por conjugados químicos y los producidos por cualquier otro método mediante el cual al menos un polipéptido de PH20 soluble se une, directa o indirectamente, a otro polipéptido o resto químico siempre que el conjugado conserve la actividad hialuronidasa. A modo de ejemplo de los conjugados proporcionados en el presente documento se incluyen polipéptidos de PH20 unidos directa o indirectamente a un dominio de multimerización, tal como un resto Fc, una toxina, un marcador o un fármaco.

50 Tal como se usa en el presente documento, una proteína de fusión se refiere a un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que contiene una secuencia codificante de una molécula de ácido nucleico y la secuencia codificante de otra molécula de ácido nucleico en la que las secuencias codificantes están en el mismo marco de lectura de manera que cuando el constructo de fusión se transcribe y se traduce en una célula huésped, la proteína que se produce contiene las dos proteínas. Las dos moléculas pueden estar adyacentes en el constructo o separadas por un polipéptido ligador que contiene 1, 2, 3, o más, pero normalmente menos de 10, 9, 8, 7 ó 6 aminoácidos. El producto de proteína codificado por un constructo de fusión se denomina polipéptido de fusión. A modo de ejemplo de polipéptidos de fusión se incluyen fusiones de Fc.

60 Tal como se usa en el presente documento, un polímero que está conjugado con una enzima que degrada hialuronano, tal como una hialuronidasa, se refiere a cualquier polímero que esté unido covalentemente o de manera estable de otra forma, directamente o por medio de un ligador, a una enzima que degrada hialuronano. Tales polímeros normalmente aumentan la semivida en suero, e incluyen, pero no se limitan a, restos siálicos, restos de pegilación, dextrano, y azúcar y otros restos, tales como para glicosilación.

Tal como se usa en el presente documento, actividad se refiere a una actividad o actividades funcionales de un polipéptido o una parte del mismo asociado con una proteína de longitud total (completa). Las actividades funcionales incluyen, pero no se limitan a, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (capacidad para unirse a o competir con un polipéptido por la unión a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, capacidad para formar multímeros, y la capacidad para unirse específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, actividad hialuronidasa se refiere a la capacidad para catalizar enzimáticamente la escisión de ácido hialurónico. El ensayo de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) XXII para hialuronidasa determina la actividad hialuronidasa indirectamente midiendo la cantidad de sustrato de ácido hialurónico de peso molecular superior, o hialuronano, (HA) que queda tras permitir que la enzima reaccione con el HA durante 30 min a 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Puede usarse una disolución de patrón de referencia en un ensayo para determinar la actividad relativa, en unidades, de cualquier hialuronidasa. Se conocen en la técnica ensayos *in vitro* para determinar la actividad hialuronidasa de hialuronidasas, tales como PH20, incluyendo PH20 soluble y esPH20, y se describen en el presente documento. Los ensayos a modo de ejemplo incluyen el ensayo de microturbidez descrito más adelante (véase por ejemplo el ejemplo 12) que mide la escisión de ácido hialurónico por hialuronidasa indirectamente detectando el precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico no escindido se une a albúmina sérica. Pueden usarse patrones de referencia, por ejemplo, para generar una curva patrón para determinar la actividad en unidades de la hialuronidasa que está sometiéndose a prueba.

Tal como se usa en el presente documento, forma activa neutra se refiere a la capacidad de un polipéptido de PH20 para catalizar enzimáticamente la escisión de ácido hialurónico a pH neutro. Una PH20 parcialmente N-glicosilada o truncada en el extremo C-terminal activa neutra proporcionada en el presente documento tiene o tiene aproximadamente el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, el 100%, el 110%, el 120%, el 130%, el 140%, el 150%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500%, el 1000% o más actividad en comparación con la actividad hialuronidasa de una correspondiente PH20 activa neutra que no está parcialmente N-glicosilada ni truncada en el extremo C-terminal.

Tal como se usa en el presente documento, una secuencia señal de unión a anclaje de GPI es una secuencia de aminoácidos C-terminal que dirige la adición de un anclaje de GPI preformado al polipéptido dentro de la luz del RE. Están presentes secuencias señal de unión a anclaje de GPI en los polipéptidos precursores de Polipéptidos con anclaje de GPI, tales como polipéptidos de PH20 con anclaje de GPI. La secuencia señal de unión a anclaje de GPI C-terminal contiene normalmente una región predominantemente hidrófoba de 8-20 aminoácidos, precedida por una región espaciadora hidrófila de 8-12 aminoácidos, inmediatamente posterior al sitio ω , o sitio de unión a anclaje de GPI. Pueden identificarse secuencias señal de unión a anclaje de GPI usando métodos bien conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, métodos *in silico* y algoritmos (véase, por ejemplo Udenfriend *et al.* (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582, Eisenhaber *et al.*, (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 741-758, Kronegg y Buloz, (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)", por ejemplo, el sitio web 129.194.185.165/dgpi/, Fankhauser *et al.*, (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852, Omaetxebarria *et al.*, (2007) *Proteomics* 7:1951-1960, Pierleoni *et al.*, (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392), incluyendo los que están fácilmente disponibles en sitios web de bioinformática, tales como el sitio de herramientas ExpASY Proteomics (por ejemplo, el sitio de Internet expasy.ch/tools/).

Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido bifucosilado se refiere a un polipéptido que tiene dos residuos de fucosa, uno con un enlace α 1,3 y el otro con un enlace α 1,6, unido al mismo núcleo de resto N-acetilglucosamina, uniéndose el resto N-acetilglucosamina al residuo de asparagina en la cadena polipeptídica. Se producen generalmente polipéptidos bifucosilados en células de insecto.

Tal como se usa en el presente documento, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser mono o bicatenarios. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están marcados opcionalmente, tal como con un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente o radiomarcador, se contemplan moléculas monocatenarias. Tales moléculas tienen normalmente una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (normalmente menos de 5, generalmente menos de 3) para estudiar con sonda o cebar una biblioteca. Generalmente, una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 ó 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria a 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.

Tal como se usa en el presente documento, un péptido se refiere a un polipéptido que es mayor de o igual a 2 aminoácidos de longitud, y menor de o igual a 40 aminoácidos de longitud. Tal como se usa en el presente documento, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento se identifican según sus abreviaturas conocidas de tres letras o una letra (Tabla 1). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones convencionales de una única letra usadas de manera rutinaria en la técnica.

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

Tal como se usa en el presente documento, "residuo de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los residuos de aminoácido descritos en el presente documento están en la forma isomérica "L". Los residuos en la forma isomérica "D", que se designan así, pueden sustituirse por cualquier residuo de L-aminoácido siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo carboxilo terminal de un polipéptido. Conforme con la nomenclatura de polipéptidos convencional descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y adoptada en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, en la tabla 1 se muestran las abreviaturas para residuos de aminoácido:

Tabla 1 - Tabla de correspondencia

| SÍMBOLO | | |
|---------|----------|--------------------|
| 1 letra | 3 letras | AMINOÁCIDO |
| Y | Tyr | Tirosina |
| G | Gly | Glicina |
| F | Phe | Fenilalanina |
| M | Met | Metionina |
| A | Ala | Alanina |
| S | Ser | Serina |
| I | Ile | Isoleucina |
| L | Leu | Leucina |
| T | Thr | Treonina |
| V | Val | Valina |
| P | Pro | Prolina |
| K | Lys | Lisina |
| H | His | Histidina |
| Q | Gln | Glutamina |
| E | Glu | Ácido glutámico |
| Z | Glx | Glu y/o Gln |
| W | Trp | Triptófano |
| R | Arg | Arginina |
| D | Asp | Ácido aspártico |
| N | Asn | Asparagina |
| B | Asx | Asn y/o Asp |
| C | Cys | Cisteína |
| X | Xaa | Desconocido u otro |

Todas las secuencias de residuos de aminoácido representadas en el presente documento por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de extremo amino-terminal a carboxilo-terminal. Además, se define que la frase "residuo de aminoácido" incluye los aminoácidos enumerados en la tabla de correspondencia (tabla 1) y aminoácidos modificados y poco comunes, tales como a los que se hace referencia en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822.

Además, debe indicarse que un guión al comienzo o al final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico con una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácido, con un grupo amino-terminal tal como NH₂ o con un grupo carboxilo-terminal tal como COOH.

Tal como se usa en el presente documento, los " α -aminoácidos que se producen de manera natural" son los residuos de los 20 α -aminoácidos encontrados en la naturaleza que se incorporan en la proteína mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm relacionado en humanos. Los aminoácidos que no se producen de manera natural incluyen por tanto, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos que se producen de manera natural e incluyen, pero no se limitan a, los isostereómeros D de aminoácidos. Se describen aminoácidos no naturales a modo de ejemplo en el presente documento y los conocen los expertos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, un constructo de ADN es una molécula de ADN lineal o circular, mono o bicatenaria que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera no encontrada en la naturaleza. Los constructos de ADN existen como resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras

copias de moléculas manipuladas.

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

Tal como se usa en el presente documento, el término polinucleótido significa un polímero mono o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótido leídas desde el extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se proporciona en el presente documento en cuanto a nucleótidos (abreviado "nt") o pares de bases (abreviado "pb"). El término nucleótidos se usa para moléculas mono o bicatenarias cuando el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, se usa para indicar la longitud global y se entenderá que es equivalente al término pares de bases. Los expertos en la técnica reconocerán que las dos hebras de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos del mismo pueden estar en bisel; por tanto todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido bicatenaria pueden no estar apareados. Tales extremos no apareados, en general, no superarán 20 nucleótidos de longitud.

Tal como se usa en el presente documento, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede basarse en el grado de identidad y/u homología de secuencias de residuos y los residuos contenidos en las mismas. Los expertos en la técnica conocen métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método de evaluación de la similitud de secuencia, dos aminoácidos o secuencias de nucleótidos se alinean de una manera que produce un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere al grado en el que las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariantes. La alineación de secuencias de aminoácidos, y en algún grado secuencias de nucleótidos, también puede explicar diferencias conservativas y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Diferencias conservativas son las que conservan las propiedades fisicoquímicas de los residuos implicados. La alineaciones pueden ser globales (alineación de las secuencias comparadas a lo largo de la longitud completa de las secuencias e incluyendo todos los residuos) o locales (la alineación de una parte de las secuencias que incluyen sólo la región o regiones más similares).

"Identidad" *per se* tiene un significado reconocido en la técnica y puede calcularse usando técnicas publicadas. (Véase, por ejemplo Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 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). Aunque existen varios métodos para medir la identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" lo conocen bien los expertos en la técnica (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

Tal como se usa en el presente documento, homólogo (con respecto a secuencias de ácido nucleico y/o de aminoácidos) significa una homología de secuencia aproximadamente mayor de o igual al 25%, normalmente una homología de secuencia mayor de o igual al 25%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95%; el porcentaje preciso puede especificarse si es necesario. Para fines en el presente documento, los términos "homología" e "identidad" se usan a menudo de manera intercambiable, a menos que se indique lo contrario. En general, para la determinación del porcentaje de homología o identidad, se alinean secuencias de modo que se obtenga la coincidencia de orden más alto (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 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; Carillo *et al.* (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Mediante la homología de secuencia, se determina el número de aminoácidos conservados mediante programas de algoritmos de alineación convencionales, y pueden usarse con penalizaciones por hueco por defecto de cada proveedor. Moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas hibridarían normalmente con rigurosidad moderada o con alta rigurosidad a lo largo de toda 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 de hibridación.

Si dos cualesquiera moléculas tienen secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que son "idénticas" u "homólogas" al 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% puede determinarse usando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FASTA", usando por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al.*, J Mol Biol 215:403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San

Diego, 1994, y Carillo *et al.* (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por ejemplo, puede usarse la función BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information para determinar la identidad. Otros programas disponibles comercial o públicamente incluyen el programa DNASTar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa "Gap" del University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) (Madison WI). El porcentaje de homología o identidad de moléculas de proteínas y/o ácido nucleico puede determinarse, por ejemplo, comparando la información de secuencia usando un programa informático GAP (por ejemplo, Needleman *et al.* (1970) J. Mol. Biol. 48:443, tal como se revisa por Smith y Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482). En resumen, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, dividido entre 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, tal como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización de 0,10 adicional para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos terminales.

Por tanto, tal como se usa en el presente documento, el término "identidad" u "homología" representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de prueba y uno de referencia. Tal como se usa en el presente documento, el término al menos "idéntico al 90%" se refiere a porcentajes de identidad de desde el 90 hasta el 99,99 en relación con el ácido nucleico de referencia o secuencia de aminoácidos del polipéptido. La identidad a un nivel del 90% o más es indicativa del hecho que, suponiendo para fines de ejemplificación, se comparan una longitud de polipéptido de prueba y de referencia de 100 aminoácidos. No más del 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de prueba difieren de los del polipéptido de referencia. Pueden hacerse comparaciones similares entre polinucleótidos de prueba y de referencia. Tales diferencias pueden representarse como mutaciones puntuales distribuidas al azar a lo largo de toda la longitud de un polipéptido o pueden agruparse en una o más ubicaciones de longitud variable hasta el máximo permisible, por ejemplo una diferencia de aminoácidos de 10/100 (identidad de aproximadamente el 90%). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácido nucleico o aminoácidos. Al nivel de homología o identidades por encima de aproximadamente el 85-90%, el resultado debe ser independiente de los parámetros del programa y huecos fijados; tales niveles altos de identidad pueden evaluarse fácilmente, a menudo mediante alineación manual sin basarse en el software.

Tal como se usa en el presente documento, una secuencia alineada se refiere al uso de la homología (similitud y/o identidad) para alinear posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Normalmente, se alinean dos o más secuencias que están relacionadas en un 50% o más de identidad. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que están alineadas en posiciones correspondientes y puede incluir la alineación de secuencias derivadas de ARN, tales como EST y otros ADNc, alineados con secuencias de ADN genómico.

Tal como se usa en el presente documento, "cebador" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN dirigida por molde en condiciones apropiadas (por ejemplo, en presencia de cuatro trifosfatos de nucleósido diferentes y un agente de polimerización, tal como ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Se apreciará que determinadas moléculas de ácido nucleico pueden servir como "sonda" y como "cebador". Un cebador, sin embargo, tiene un grupo hidroxilo en 3' para la extensión. Un cebador puede usarse en una variedad de métodos, incluyendo, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR con transcriptasa inversa (RT), PCR de ARN, LCR, PCR múltiple, PCR *panhandle*, PCR de captura, PCR de expresión, RACE en 3' y 5', PCR *in situ*, PCR mediada por ligación y otros protocolos de amplificación.

Tal como se usa en el presente documento, "par de cebadores" se refiere a un conjunto de cebadores que incluye un cebador en 5' (en el sentido de 5') que se hibrida con el extremo 5' de una secuencia que va a amplificarse (por ejemplo mediante PCR) y un cebador en 3' (en el sentido de 3') que se hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia que va a amplificarse.

Tal como se usa en el presente documento, "se hibrida específicamente" se refiere al apareamiento, mediante apareamiento de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo un oligonucleótido) con una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la técnica están familiarizados con parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan a la hibridación específica, tal como la longitud y composición de la molécula particular. Los parámetros particularmente relevantes para la hibridación *in vitro* incluyen además la temperatura de apareamiento y lavado, la composición del tampón y la concentración de sal. Condiciones de lavado a modo de ejemplo para eliminar moléculas de ácido nucleico no unidas específicamente con alta rigurosidad son 0,1 x SSPE, SDS al 0,1%, 65°C, y con rigurosidad media son 0,2 x SSPE, SDS al 0,1%, 50°C. Se conocen en la técnica condiciones de rigurosidad equivalentes. El experto puede ajustar fácilmente estos parámetros para lograr la hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico diana apropiada para una aplicación particular. Complementarias, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos pueden hibridarse, normalmente con menos del 25%, el 15% o el 5% de apareamientos erróneos entre nucleótidos opuestos. Si es necesario, se especificará el porcentaje de complementariedad. Normalmente las dos moléculas se seleccionan de manera que hibridarán en condiciones de alta rigurosidad.

Tal como se usa en el presente documento, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar de modo que la propiedad de interés esté suficientemente no cambiada de modo que el producto sustancialmente idéntico pueda usarse en lugar del producto.

5 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que los términos “sustancialmente idéntico” o “similar” varían con el contexto tal como entienden los expertos en la técnica relevante.

10 Tal como se usa en el presente documento, una variante alélica o variación alélica hace referencia a cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de manera natural a través de mutación, y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar para polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos alterada. El término “variante alélica” también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. Normalmente la forma de referencia del gen codifica para una forma de tipo natural y/o forma predominante de un polipéptido de una población o un único miembro de referencia de una especie. Normalmente, las variantes alélicas, que incluyen variantes entre especies tienen normalmente una identidad de aminoácidos de al menos el 80%, el 90% o mayor con una forma de tipo natural y/o predominante de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y si la comparación es entre especies o dentro de la especie. Generalmente, las variantes alélicas dentro de la especie tienen una identidad de al menos aproximadamente el 80%, el 85%, el 90% o el 95% o mayor con una forma de tipo natural y/o predominante, incluyendo una identidad del 96%, el 97%, el 98%, el 99% o mayor con una forma de tipo natural y/o predominante de un polipéptido. La referencia a una variante alélica en el presente documento se refiere generalmente a variaciones en proteínas entre miembros de la misma especie.

25 Tal como se usa en el presente documento, “alelo”, que se usa de manera intercambiable en el presente documento con “variante alélica” se refiere a formas alternativas de un gen o partes del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o posición en cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigoto para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigoto para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un único nucleótido o varios nucleótidos, y pueden incluir modificaciones tales como sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

35 Tal como se usa en el presente documento, variantes de especie se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, tales como ratón y humano. Variantes de especie a modo de ejemplo proporcionadas en el presente documento son PH20 de primate, tal como, pero sin limitarse a, humano, chimpancé, macaco y mono cynomologus. Generalmente, las variantes de especie tienen una identidad de secuencia del 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o. Pueden determinarse residuos entre variantes de especie comparando y alineando secuencias para maximizar el número de nucleótidos o residuos coincidentes, por ejemplo, de manera que la identidad entre las secuencias es igual a o mayor del 95%, igual a o mayor del 96%, igual a o mayor del 97%, igual a o mayor del 98% o igual a o mayor del 99%. A la posición de interés se le da entonces el número asignado en la molécula de ácido nucleico de referencia. La alineación puede efectuarse manualmente o a simple vista, particularmente, cuando la identidad de secuencia es mayor del 80%. Por ejemplo, la alineación en la figura 1 muestra que el residuo de aminoácido 491 de PH20 humana corresponde al residuo de aminoácido 491 de PH20 de chimpancé y el residuo de aminoácido 497 de PH20 humana corresponde al residuo de aminoácido 498 de PH20 de chimpancé.

50 Tal como se usa en el presente documento, una variante de corte y empalme se refiere a una variante producida mediante procesamiento diferencial de un transcrito primario de ADN genómico que da como resultado más de un tipo de ARNm.

55 Tal como se usa en el presente documento, 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 de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Los métodos de modificación de un polipéptido son rutinarios para los expertos en la técnica, tal como usando metodologías de ADN recombinante.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término promotor significa una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que proporcionan la unión de ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Las secuencias de promotor se encuentran comúnmente, pero no siempre, en la región no codificante en 5' de los genes.

65 Tal como se usa en el presente documento, proteína o polipéptido purificado o aislado o parte biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido del que se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Puede determinarse que las preparaciones están sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables tal como se determina mediante métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía en capa fina (CCF), electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC),

5 usados por los expertos en la técnica para evaluar tal pureza, o que son suficientemente puras de manera que la purificación adicional no alteraría de manera detectable las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la técnica conocen métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente puros químicamente. Sin embargo, un compuesto sustancialmente puro químicamente, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

10 Por tanto, la referencia a un polipéptido sustancialmente purificado, tal como una PH20 soluble extendida sustancialmente purificada se refiere a preparaciones de proteínas PH20 que están sustancialmente libres de material celular e incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína está separada de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de manera recombinante. En una realización, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de proteínas no enzimáticas (también denominadas en el presente documento proteínas contaminantes), generalmente menos de aproximadamente el 20% de proteínas no enzimáticas o el 10% de proteínas no enzimáticas o menos de aproximadamente el 5% de proteínas no enzimáticas. Cuando la proteína enzimática se produce de manera recombinante, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, el 10% o el 5% del volumen de la preparación de proteína enzimática.

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

25 Tal como se usa en el presente documento, sintético, con referencia a, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico sintético o un gen sintético o un péptido sintético se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula de polipéptido que se produce por métodos recombinantes y/o por métodos de síntesis química.

30 Tal como se usa en el presente documento, la producción por medios recombinantes o el uso de métodos de ADN recombinante significa el uso de los métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.

35 Tal como se usa en el presente documento, vector (o plásmido) se refiere a elementos diferenciados que se usan para introducir un ácido nucleico heterólogo en células para o bien la expresión o bien la replicación del mismo. Los vectores permanecen normalmente episomales, pero pueden diseñarse para efectuar la integración de un gen o parte 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 mamífero. La selección y el uso de tales vehículos los conocen bien los expertos en la técnica.

40 Tal como se usa en el presente documento, un vector de expresión incluye vectores que pueden expresar ADN que está operativamente unido a secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que pueden efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias de promotor y terminador, 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 se derivan generalmente de ADN de plásmido o viral, o pueden contener elementos de ambos. Por tanto, un vector de expresión se refiere a un constructo de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, tras su introducción en una célula huésped apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los expertos en la técnica conocen bien vectores de expresión apropiados e incluyen los que pueden replicarse en células eucariotas y/o células procariotas y los que permanecen episomales o los que se integran en el genoma de la célula huésped.

55 Tal como se usa en el presente documento, vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales". Vectores virales son virus modificados por ingeniería genética que están operativamente unidos a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos al interior de células.

60 Tal como se usa en el presente documento, "operablemente" u "operativamente unido" cuando se hace referencia a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan en concierto para sus fines previstos, por ejemplo, inicio de la transcripción en el sentido de 3' del promotor y en el sentido de 5' de cualquier secuencia transcrita. El promotor es habitualmente el dominio al que se une la maquinaria de transcripción para iniciar la transcripción y avanza a través del segmento codificante hasta el terminador.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "evaluar" pretende incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteasa, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también de obtener un índice, una razón, un porcentaje, un valor visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y por supuesto no es necesario que la

especie química realmente detectada sea el propio producto de proteólisis sino que puede ser por ejemplo un derivado de la misma o alguna sustancia adicional. Por ejemplo, la detección de un producto de escisión de una proteína del complemento, tal como mediante SDS-PAGE y tinción de proteínas con azul de Coomassie.

5 Tal como se usa en el presente documento, actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o a las respuestas fisiológicas que resultan tras la administración *in vivo* de un compuesto, una composición u otra mezcla. La actividad biológica, por tanto, engloba efectos terapéuticos y actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Pueden observarse actividades biológicas en sistemas *in vitro* diseñados para someter a prueba o usar tales actividades. Por tanto, para fines en el presente documento, una actividad biológica de una
10 proteasa es su actividad catalítica en la que se hidroliza un polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento equivalente, cuando se hace referencia a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican para la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando se usa equivalente en referencia a dos proteínas o péptidos, significa que las dos
15 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 el péptido. Cuando equivalente se refiere a una propiedad, no es necesario que la propiedad esté presente en el mismo grado (por ejemplo, dos péptidos pueden presentar diferentes tasas del mismo tipo de actividad enzimática), sino que las actividades son habitualmente las mismas sustancialmente.

20 Tal como se usa en el presente documento, “modular” y “modulación” o “alterar” se refieren a un cambio de una actividad de una molécula, tal como una proteína. Las actividades a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, actividades biológicas, tales como transducción de señales. La modulación puede incluir un aumento en la actividad (es decir, regulación por incremento o actividad agonista), una disminución en la actividad (es decir, regulación por
25 disminución o inhibición) o cualquier otra alteración en una actividad (tal como un cambio en periodicidad, frecuencia, duración, cinética u otro parámetro). La modulación puede ser dependiente del contexto y normalmente se compara la modulación con un estado designado, por ejemplo, la proteína de tipo natural, la proteína en un estado constitutivo o la proteína tal como se expresa en una condición o tipo de célula designado.

30 Tal como se usa en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla. Puede ser una disolución, una suspensión, un líquido, un polvo, una pasta, una disolución acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

35 Tal como se usa en el presente documento, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más 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 única mezcla de los dos o más artículos, o cualquier variación de los mismos. Los elementos de una combinación están generalmente asociados o relacionados funcionalmente.

40 Tal como se usa en el presente documento, “enfermedad o trastorno” se refiere a un estado patológico en un organismo que resulta de una causa o un estado que incluye, pero no se limita a, infecciones, estados adquiridos, estados genéticos, y caracterizado por síntomas identificables. Las enfermedades y los trastornos de interés en el presente documento son los que implican componentes de la ECM. Tal como se usa en el presente documento, “tratar” un sujeto con una enfermedad o un estado significa que los síntomas del sujeto se alivian parcial o
45 totalmente, o permanecen estáticos tras el tratamiento. Por tanto tratamiento engloba profilaxis, terapia y/o cura. Profilaxis se refiere a la prevención de una posible enfermedad y/o a una prevención del empeoramiento de síntomas o la progresión de una enfermedad. Tratamiento también engloba cualquier uso farmacéutico de un interferón modificado y composiciones proporcionadas en el presente documento.

50 Tal como se usa en el presente documento, un agente farmacéuticamente eficaz incluye cualquier agente terapéutico o agente bioactivo, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes de dispersión, agentes terapéuticos convencionales, fármacos de molécula pequeña, incluyendo, pero sin limitarse a, bisfosfonatos, y proteínas terapéuticas, incluyendo, pero sin limitarse a, insulina, moléculas de IgG y anticuerpos.

55 Tal como se usa en el presente documento, un agente terapéutico incluye cualquier agente farmacéuticamente eficaz o agente bioactivo, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes de dispersión, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo fármacos de molécula pequeña, incluyendo, pero sin limitarse a, bisfosfonatos, y proteínas terapéuticas, incluyendo, pero sin limitarse a, insulina, moléculas de IgG y anticuerpos.
60

Tal como se usa en el presente documento, tratamiento significa cualquier manera en la que los síntomas de un estado, trastorno o enfermedad u otra indicación, mejoran o se alteran de manera beneficiosa de otra forma.

65 Tal como se usa en el presente documento, efecto terapéutico significa un efecto que resulta del tratamiento de un sujeto que altera, normalmente alivia o mejora los síntomas de una enfermedad o un estado o que cura una enfermedad o un estado. Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de una composición, una

molécula o un compuesto que da como resultado un efecto terapéutico tras su administración a un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a un animal, incluyendo un mamífero, tal como un humano.

5 Tal como se usa en el presente documento, un paciente se refiere a un sujeto humano que presenta síntomas de una enfermedad o un trastorno.

10 Tal como se usa en el presente documento, mejora de los síntomas de una enfermedad o un trastorno particular mediante un tratamiento, tal como mediante administración de una composición farmacéutica u otro producto terapéutico, se refiere a cualquier reducción, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que pueden atribuirse a o asociarse con la administración de la composición o producto terapéutico.

15 Tal como se usa en el presente documento, prevención o profilaxis se refiere a métodos en los que se reduce el riesgo de desarrollar una enfermedad o estado.

20 Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz” o una “dosis terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de un agente, un compuesto, un material o una composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Por tanto, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o un trastorno.

Tal como se usa en el presente documento, forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente tal como se conoce en la técnica.

25 Tal como se usa en el presente documento, una formulación de una única dosificación se refiere a una formulación para administración directa.

30 Tal como se usa en el presente documento, un “artículo de fabricación” es un producto que se fabrica y se vende. Tal como se usa a lo largo de esta solicitud, el término pretende englobar un agente terapéutico con una PH20 soluble, tal como es PH20, o una esPH20 sola, contenida en el mismo artículo o en artículos separados de envasado.

35 Tal como se usa en el presente documento, fluido se refiere a cualquier composición que pueda fluir. Los fluidos engloban por tanto composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, disoluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras de tales composiciones.

40 Tal como se usa en el presente documento, un “kit” se refiere a una combinación de composiciones proporcionadas en el presente documento y otro artículo para un fin incluyendo, pero sin limitarse a, reconstitución, activación, e instrumentos/dispositivos para el suministro, la administración, el diagnóstico y la evaluación de una actividad biológica o propiedad. Los kits incluyen opcionalmente instrucciones para su uso.

Tal como se usa en el presente documento, un lisado o extracto celular se refiere a una preparación o fracción que se prepara a partir de una célula rota o lisada.

45 Tal como se usa en el presente documento, animal incluye cualquier animal, tal como, pero sin limitarse a primates incluyendo 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 humanos como el animal contemplado. Las enzimas proporcionadas en el presente documento proceden de cualquier fuente, animal, planta, organismo procariota y fúngico. La mayoría de las enzimas son de origen animal, incluyendo origen de mamífero.

50 Tal como se usa en el presente documento, un control se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de prueba, excepto porque no se trata con un parámetro de prueba, o, si es una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no afectado por el estado de interés. Un control también puede ser un control interno.

55 Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a un compuesto que comprende “un dominio extracelular” incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

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

65 Tal como se usa en el presente documento, “opcional” u “opcionalmente” significa que la circunstancia o el acontecimiento descrito posteriormente se produce o no se produce, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia se produce y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente

sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

Tal como se usa en el presente documento, 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 de la IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (véase, (1972) Biochem. 11:1726).

B. Visión general

Las hialuronidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de ácido hialurónico, disminuyendo de ese modo la viscosidad de ácido hialurónico y aumentando la permeabilidad tisular. PH20 es una hialuronidasa activa neutra y activa ácida que presenta actividad óptima cuando está glicosilada. PH20 humana es una proteína con anclaje de GPI que está anclada al lado extracelular de la membrana plasmática por medio de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) unido al extremo C-terminal de la proteína. La adición del anclaje de GPI a todas las proteínas con anclaje de GPI se produce tras la escisión en una posición de aminoácido específica, denominada el sitio ω (normalmente ubicado aproximadamente 20-30 aminoácidos desde el extremo C-terminal), y la eliminación de la parte C-terminal en el RE. Esta parte C-terminal es la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. La secuencia señal de unión a anclaje de GPI de PH20 humana se ubica en las posiciones de aminoácido 491-509 del precursor polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 107, y el sitio ω es la posición de aminoácido 490. Los polipéptidos con anclaje de GPI de PH20 tales como PH20 humana están unidos a la membrana y, por tanto, son insolubles. Las formas insolubles de PH20 normalmente no son adecuadas para fines terapéuticos.

Polipéptidos de PH20 que carecen de un anclaje de GPI se secretan generalmente por células tras su expresión porque no contienen una secuencia señal de unión a GPI que bloquea el polipéptido en la membrana. Se encuentra en el presente documento que las formas solubles de PH20 también incluyen las que contienen residuos dentro de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. Polipéptidos de PH20 soluble extendida (esPH20) son proteínas PH20 solubles que están truncadas en el extremo C-terminal pero conservan uno o más residuos de aminoácido ubicados en la secuencia señal de unión a anclaje de GPI del correspondiente polipéptido de PH20 de tipo natural. Tales polipéptidos de esPH20 son solubles y pueden usarse como polipéptidos terapéuticos, tal como para tratar enfermedades o estados asociados a hialuronano y/o para servir como agente de extensión o dispersión para promover, potenciar o aumentar la dispersión y el suministro de otros agentes, fármacos y proteínas mejorando de ese modo el perfil farmacocinético y farmacodinámico del agente, fármaco o proteína administrado conjuntamente.

1. PH20

PH20, también conocida como proteína de superficie de espermatozoide, molécula de adhesión de espermatozoide 1, SPAM1 o HYAL3, es una hialuronidasa. Las hialuronidasas son una familia de enzimas que degradan ácido hialurónico (también conocido como hialuronano o hialuronato o HA), un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Al catalizar la hidrólisis de ácido hialurónico, la hialuronidasa disminuye la viscosidad de ácido hialurónico, aumentando de ese modo la permeabilidad tisular. Como tal, se han usado hialuronidasas, por ejemplo, como agente de extensión o dispersión conjuntamente con otros agentes, fármacos y proteínas para potenciar su dispersión y suministro, y para mejorar el perfil farmacocinético y farmacodinámico del agente, fármaco o proteína administrado conjuntamente.

PH20, como otras hialuronidasas de mamífero, es una endo- β -N-acetil-hexosaminidasa que hidroliza el enlace glicosídico $\beta 1 \rightarrow 4$ del ácido hialurónico para dar diversas longitudes de oligosacárido tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. PH20 tiene actividades tanto hidrolítica como transglicosidasa y puede degradar ácido hialurónico y sulfatos de condroitina, tales como C4-S y C6-S. PH20 está implicada de manera natural en la adhesión espermatozoide-óvulo y ayuda en la penetración del espermatozoide en la capa de células del cúmulo digiriendo el ácido hialurónico. PH20 se ubica en la superficie del espermatozoide, y en el acrosoma derivado de lisosomas, en donde está unida a la membrana acrosómica interna. La PH20 de la membrana plasmática tiene actividad hialuronidasa sólo a pH neutro, mientras que la PH20 de la membrana acrosómica tiene actividad a pH tanto neutro como ácido. Además de ser una hialuronidasa, PH20 también parece ser un receptor para la señalización celular inducida por HA, y un receptor para la zona pelúcida que rodea al ovocito.

Las proteínas PH20 a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de PH20 de humano (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 107, polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 108), bovinos (SEQ ID NO: 111 y 119), de conejo (SEQ ID NO: 112), ovinos (SEQ ID NO: 113, 118 y 120), de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 114), de cobaya (SEQ ID NO: 115), de rata (SEQ ID NO: 116), de ratón (SEQ ID NO: 117), de chimpancé (SEQ ID NO: 197) y de mono rhesus (SEQ ID NO: 198). El transcrito de ARNm de PH20 humana se traduce normalmente generando una proteína precursora de 509 aminoácidos (SEQ ID NO: 107) que contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en el extremo N-terminal (posiciones de residuos de aminoácido 1-35 de SEQ ID NO: 107). Por tanto, tras el transporte al RE y la eliminación del péptido señal, se produce un polipéptido maduro de 474 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 108. Tal como se comenta a continuación, se escinde entonces un péptido C-terminal en el RE para facilitar la unión covalente de un anclaje de GPI al aminoácido C-terminal recién formado en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 490 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 107.

PH20 humana es la hialuronidasa activa neutra prototípica que se bloquea generalmente en la membrana plasmática por medio de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Tal como se indicó anteriormente, PH20 también se expresa en la membrana acrosómica interna en donde tiene actividad hialuronidasa a pH tanto neutro como ácido. Pruebas sugieren que la región de péptido 1 de PH20, que corresponde a los aminoácidos 142-172 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 107, se requiere para la actividad enzimática a pH neutro. La región de péptido 3, que corresponde a los aminoácidos 277-297 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 107, parece ser importante para la actividad enzimática a pH ácido (Cherr *et al.*, (2001) *Matrix Biology* 20:515-525). Por tanto, parece que PH20 contiene dos sitios catalíticos. Además de los sitios catalíticos, PH20 también contiene un sitio de unión a hialuronano. Pruebas experimentales sugieren que este sitio está ubicado en la región de péptido 2, que corresponde a las posiciones de aminoácido 205-235 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 107. Esta región está altamente conservada entre hialuronidasas y es similar al motivo de unión a heparina.

a. Glicosilación

La glicosilación, incluyendo glicosilación con unión a N y a O, de alguna enzima que degrada hialuronanos, incluyendo hialuronidasas, puede ser importante para su actividad catalítica y estabilidad. Los oligosacáridos unidos a N pertenecen a varios tipos principales (oligomanosa, complejos, híbridos), todos los cuales tienen núcleos de (Man)₃-GlcNAc-GlcNAc unidos por medio del nitrógeno de amida de residuos de Asn que se encuentran dentro de secuencias de -Asn-Xaa-Thr/Ser- (en donde Xaa no es Pro). Se ha notificado un sitio de glicosilación adicional en -Asn-Xaa-Cys- para la proteína de coagulación C. En algunos casos, una enzima que degrada hialuronano, tal como una hialuronidasa, puede contener uniones tanto N-glicosídicas como O-glicosídicas. Por ejemplo, PH20 tiene un oligosacárido unido a O en el aminoácido T475 así como seis oligosacáridos unidos a N en los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humana, ejemplificado en SEQ ID NO: 107. Los residuos de aminoácido N82, N166 y N254 están ocupados por glicanos de tipo complejo mientras que los residuos de aminoácido N368 y N393 están ocupados por glicanos de tipo de alto contenido en manosa (véase, por ejemplo el ejemplo 6 a continuación). El residuo de aminoácido N235 está ocupado por aproximadamente el 80% de glicanos de tipo de alto contenido en manosa y el 20% de glicanos de tipo complejo.

Aunque alterar el tipo de modificación con glicanos de una glicoproteína puede tener efectos drásticos sobre la antigenicidad de una proteína, el plegamiento estructural, la solubilidad y la estabilidad, no se cree que la mayoría de las enzimas requieran glicosilación para lograr una actividad enzimática óptima. Para algunas hialuronidasas, la eliminación de la glicosilación con unión a N puede dar como resultado una inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. Por tanto, para tales hialuronidasas, se requiere la presencia de glicanos unidos a N para generar una enzima activa. Se requiere la presencia de glicanos unidos a N en polipéptidos de PH20 para generar una enzima activa. Por ejemplo, se encuentra en el presente documento que la desglicosilación completa de PH20 humana, mediante tratamiento con el inhibidor de endoglicosidasa PNGasaF o GlcNAc fosfotransferasa (GPT) tunicamicina, da como resultado la pérdida total de actividad hialuronidasa (véanse, por ejemplo, los ejemplos 7-8, más adelante). En cambio, la desglicosilación parcial de PH20 humana, mediante tratamiento con endoglicosidasa EndoF1, EndoF2, EndoF3 o EndoH, no afecta a la actividad hialuronidasa de PH20 humana (véase, por ejemplo, el ejemplo 7, más adelante).

b. Anclaje de GPI

PH20 humana es una proteína con anclaje de GPI. Como tal, el polipéptido de PH20 está anclado al lado extracelular de la membrana plasmática por medio de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) unido al extremo C-terminal de la proteína. Las proteínas con anclaje de GPI tales como PH20 humana se traducen con un péptido señal N-terminal escindible que dirige la proteína al retículo endoplasmático (RE). En el extremo C-terminal de estas proteínas, hay otra secuencia señal que dirige la adición de un anclaje de GPI preformado al polipéptido dentro de la luz del RE. La adición del anclaje de GPI se produce tras la escisión de la parte C-terminal en una posición de aminoácido específica, denominada el sitio ω (normalmente ubicado aproximadamente 20-30 aminoácidos desde el extremo C-terminal). Aunque parece que no hay secuencia consenso para identificar la ubicación del sitio ω , las proteínas con anclaje de GPI contienen una secuencia señal de unión a anclaje de GPI C-terminal o dominio que contiene normalmente una región predominantemente hidrófoba de 8-20 aminoácidos, precedida por una región espaciadora hidrófila de 8-12 aminoácidos inmediatamente en el sentido de 3' del sitio ω . Esta región espaciadora hidrófila a menudo es rica en aminoácidos cargados y prolina (White *et al.*, (2000) *J. Cell Sci.* 113(Pt.4):721-727). Un análisis más detallado sugiere que hay una región de aproximadamente 11 aminoácidos antes de la posición ω -1 que se caracteriza por una baja cantidad de estructura secundaria predicha, una región alrededor del sitio de escisión (sitio ω), desde ω -1 hasta ω +2 que se caracteriza por la presencia de residuos de cadena lateral pequeña, la región espaciadora entre las posiciones ω +3 y ω +9, y una cola hidrófoba desde ω +10 hasta el extremo C-terminal (Pierleoni *et al.*, (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392).

Aunque no hay secuencia consenso de señal de unión a anclaje de GPI, se han desarrollado diversos métodos y algoritmos *in silico* que pueden usarse para identificar tales secuencias en polipéptidos (véanse, por ejemplo Udenfriend *et al.* (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582; Eisenhaber *et al.*, (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 741-758;

Kronegg y Buloz, (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)", 129.194.185.165/dgpi; Fankhauser *et al.*, (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852; Omaetxebarria *et al.*, (2007) *Proteomics* 7:1951-1960; Pierleoni *et al.*, (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392), incluyendo los que están fácilmente disponibles en sitios web de bioinformática, tales como el sitio de herramientas ExPASy Proteomics (expasy.ch/tools/). Por tanto, un experto en la técnica puede determinar si un polipéptido de PH20 contiene probablemente una secuencia señal de unión a anclaje de GPI, y, por tanto, si el polipéptido de PH20 es una proteína con anclaje de GPI.

La secuencia señal de unión a anclaje de GPI de PH20 humana se ubica en las posiciones de aminoácido 491-509 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 107, y el sitio ω es la posición de aminoácido 490. Por tanto, en este modelado de PH20 humana, los aminoácidos 491-509 se escinden tras el transporte al RE y se une covalentemente un anclaje de GPI al residuo de serina en la posición 490. La unión covalente de un anclaje de GPI al extremo C-terminal de PH20 humana y, por tanto, la naturaleza unida a la membrana de PH20, se ha confirmado usando estudios de hidrólisis con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) (véase, por ejemplo, Lin *et al.*, (1994) *J. Biol. Chem.* 269:1157-1163 y el ejemplo 3, más adelante). Las fosfolipasas C (PI-PLC) y D (PI-PLD) específicas de fosfatidilinositol hidrolizan el anclaje de GPI, liberando el polipéptido de PH20 de la membrana celular. El polipéptido de PH20 liberado resultante es, por tanto, soluble. PH20 soluble puede detectarse y distinguirse de la PH20 unida a la membrana, insoluble usando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, los que usan un ensayo de Triton® X-114, tal como se describe a continuación y en el ejemplo 4. En este ensayo, las hialuronidasas PH20 solubles se reparten en la fase acuosa de una disolución de Triton® X-114 calentada hasta 37°C (Bordier *et al.*, (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7) mientras que las hialuronidasas PH20 ancladas a la membrana se reparten en la fase rica en detergente. Por tanto, además de usar algoritmos para evaluar si un polipéptido de PH20 tiene anclaje de GPI de manera natural, también pueden realizarse experimentos de solubilidad.

C. Polipéptidos de PH20 soluble extendida

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 soluble extendida (esPH20) y composiciones. Polipéptidos de esPH20 a modo de ejemplo proporcionados en el presente documento son polipéptidos de esPH20 de primate, incluyendo, pero sin limitarse a, polipéptidos de esPH20 de humano y chimpancé. Los polipéptidos de esPH20 proporcionados en el presente documento son solubles, es decir, proteínas PH20 secretadas que están truncadas en el extremo C-terminal pero que conservan al menos uno o más residuos de aminoácido ubicados en la secuencia señal de unión a anclaje de GPI del correspondiente polipéptido de PH20 de tipo natural (por ejemplo están truncadas en las posiciones de aminoácido 491-500). Los polipéptidos de esPH20 pueden producirse a partir de cualquier polipéptido de PH20 con anclaje de GPI mediante modificación del polipéptido de PH20 con anclaje de GPI, es decir mediante la eliminación de una parte de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI, siempre que el polipéptido de esPH20 sea soluble. La solubilidad, o secreción al medio de cultivo celular, puede determinarse mediante SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia de tipo Western tras la expresión, o alternativamente, en un ensayo de Triton® X-114, tal como se describe a continuación y en el ejemplo 4, cuando el polipéptido de PH20 se produce mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, incluyendo expresión recombinante y síntesis de polipéptidos. Los polipéptidos de esPH20 proporcionados en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, como polipéptidos terapéuticos, tales como un agente de extensión o dispersión conjuntamente con otros agentes, fármacos y proteínas para potenciar su dispersión y suministro, y para mejorar el perfil farmacocinético y farmacodinámico del agente, fármaco o proteína administrado conjuntamente.

Los polipéptidos de esPH20 proporcionados en el presente documento contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos de aminoácido de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI, siempre que el polipéptido de esPH20 sea soluble, es decir, se reparta en la fase acuosa de una disolución de Triton® X-114, tal como se describe más adelante. Los polipéptidos de PH20 soluble extendida proporcionados en el presente documento pueden producirse realizando truncamientos C-terminales en cualquier polipéptido de PH20 con anclaje de GPI de manera natural, en el que el polipéptido de esPH20 resultante es soluble y contiene 1 o más residuos de aminoácido de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. Un experto en la técnica puede determinar si un polipéptido de PH20 tiene anclaje de GPI usando métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limita a, el uso de algoritmos conocidos para predecir la presencia y ubicación de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI y el sitio ω , y la realización de ensayos de solubilidad antes y después de la digestión con fosfolipasa C (PI-PLC) o D (PI-PLD) específica de fosfatidilinositol.

Los polipéptidos de esPH20 a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de esPH20 de primates, tales como, por ejemplo, polipéptidos de esPH20 de humano y chimpancé. Por ejemplo, los polipéptidos de esPH20 proporcionados en el presente documento pueden prepararse mediante truncamiento C-terminal de cualquiera de los polipéptidos maduros o precursores expuestos en SEQ ID NO: 107, 108 ó 197, o variaciones alélicas u otras de los mismos, incluyendo fragmentos activos de los mismos, en los que el polipéptido resultante es soluble y conserva 1 o más residuos de aminoácido de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. Las variantes alélicas y otras variantes las conoce un experto en la técnica, e incluyen polipéptidos que tienen una identidad de secuencia del 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95% o más con cualquiera de SEQ ID NO: 107, 108 y 197. Los polipéptidos de esPH20 proporcionados en el presente documento pueden estar truncados en el

extremo C-terminal en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo natural, tal como un polipéptido con una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 107, 108 y 197, siempre que el polipéptido de esPH20 resultante sea soluble y conserve 1 o más residuos de aminoácido de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI.

Los polipéptidos de PH20 soluble extendida proporcionados en el presente documento conservan la actividad hialuronidasa. Adicionalmente, los polipéptidos de esPH20 son activos neutros, es decir, conservan la actividad hialuronidasa a pH neutro. La actividad hialuronidasa puede aumentar o disminuir en comparación con la forma con anclaje de GPI de tipo natural de la PH20. Por ejemplo, los polipéptidos de esPH20 proporcionados en el presente documento pueden presentar actividad hialuronidasa que es el 1%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, el 110%, el 120%, el 130%, el 140%, el 150%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500%, el 1000% o más de la actividad hialuronidasa presentada por la forma con anclaje de GPI de tipo natural.

1. Polipéptidos de esPH20 humana

Polipéptidos de esPH20 a modo de ejemplo proporcionados en el presente documento son polipéptidos de esPH20 humana. Los polipéptidos de esPH20 humana proporcionados en el presente documento son solubles y contienen 1 o más residuos de aminoácido de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. Por tanto, se proporcionan en el presente documento formas solubles de PH20 humana cuyo GPI no carece completamente de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI.

Los polipéptidos de esPH20 humana precursores proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, los que tienen truncamientos C-terminales para generar polipéptidos que contienen del aminoácido 1 al aminoácido 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 ó 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 107. Cuando se expresa en células de mamífero, la secuencia señal N-terminal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y se secreta la forma madura de la proteína. Por tanto, los polipéptidos de esPH20 humana maduros contienen los aminoácidos 36 a 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 ó 500 de SEQ ID NO: 107. Por tanto, los polipéptidos de esPH20 humana maduros proporcionados en el presente documento incluyen los expuestos en SEQ ID NO: 59-63 y 100-104, o variantes alélicas u otras de los mismos.

Los polipéptidos de esPH20 humana proporcionados en el presente documento pueden expresarse en células CHO, o producirse alternativamente en cualquier célula o mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, siempre que sean solubles y contengan al menos un aminoácido de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. Los polipéptidos de esPH20 humana solubles producidos en células CHO son los que se secretan al medio de cultivo celular. Un experto en la técnica entiende que una esPH20 humana puede secretarse parcialmente, es decir, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más del polipéptido expresado se secreta al medio de cultivo, siempre que la esPH20 secretada sea soluble, es decir, se reparta en la fase acuosa de una disolución de Triton® X-114, tal como se describe más adelante. Los polipéptidos de esPH20 humana proporcionados en el presente documento que contienen los aminoácidos 1-500, ó 36-500, se secretan parcialmente. De manera adicional, cuando se expresan en células CHO, los polipéptidos de esPH20 humana precursores que contienen los aminoácidos 1 a 498, 499 ó 500, o los polipéptidos de esPH20 humana maduros que contienen los aminoácidos 36 a 498, 499 ó 500, se expresan débilmente (véase, por ejemplo, el ejemplo 3 a continuación).

Por tanto, los polipéptidos de esPH20 humana precursores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cualquiera que tenga truncamientos C-terminales para generar polipéptidos que contienen del aminoácido 1 al aminoácido 491, 492, 493, 494, 495, 496 ó 497 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 107. Cuando se expresan en células de mamífero, tras la escisión del péptido señal N-terminal durante el procesamiento, los polipéptidos de esPH20 humana maduros contienen los aminoácidos 36 a 491, 492, 493, 494, 495, 496 ó 497 de SEQ ID NO: 107. Por tanto, los polipéptidos de esPH20 humana maduros a modo de ejemplo proporcionados en el presente documento incluyen los que tienen 456, 457, 458, 459, 460, 461 ó 462 aminoácidos de longitud, tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 60-63 y 102-104, o variantes alélicas u otras de los mismos. Un experto en la técnica conoce variantes alélicas y otras variantes, e incluyen polipéptidos que tienen una identidad de secuencia del 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95% o más con cualquiera de SEQ ID NO: 107 ó 108.

También se proporcionan en el presente documento polipéptidos de esPH20 humana sustituidos con aminoácidos. Los polipéptidos de esPH20 sustituidos con aminoácidos son polipéptidos de esPH20 humana que están modificados de manera que contienen sustituciones de aminoácidos, en comparación con los polipéptidos de esPH20 humana proporcionados en el presente documento, por ejemplo, tal como se exponen en SEQ ID NO: 60-63 y 102-104. Por tanto, polipéptidos de esPH20 humana sustituidos con aminoácidos son los que tienen truncamientos C-terminales. En algunos ejemplos, los polipéptidos de esPH20 humana sustituidos con aminoácidos proporcionados en el presente documento tienen una identidad de secuencia al menos el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 87%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 1 a 491, 492, 493, 494, 495, 496 ó 497, o aminoácidos 36 a 491, 492, 493, 494, 495, 496 ó 497, de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID

NO: 107. En otros ejemplos, los polipéptidos de esPH20 humana sustituidos con aminoácidos tienen una identidad de secuencia del 85%, el 87%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 60-63 y 102-104.

5 Los polipéptidos de esPH20 humana proporcionados en el presente documento pueden presentar actividad hialuronidasa que está aumentada o disminuida en comparación con la forma con anclaje de GPI de tipo natural de PH20. Por ejemplo, los polipéptidos de esPH20 humana proporcionados en el presente documento pueden presentar actividad hialuronidasa que es el 1%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, el 110%, el 120%, el 130%, el 140%, el 150%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500%, el 1000% o más de la actividad hialuronidasa presentada por la forma con anclaje de GPI de tipo natural. En algunos ejemplos, los polipéptidos de esPH20 humana presentan actividad hialuronidasa aumentada en comparación con la forma con anclaje de GPI de tipo natural. La actividad hialuronidasa de los polipéptidos de esPH20 humana puede estar aumentada en el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, el 110%, el 120%, el 130%, el 140%, el 150%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500%, el 1000% o más en comparación con la actividad hialuronidasa de la forma con anclaje de GPI de tipo natural.

Los polipéptidos de esPH20 humana proporcionados en el presente documento presentan actividad hialuronidasa activa neutra, o actividad hialuronidasa cuando se mide a pH neutro, que está aumentada o disminuida en comparación con la forma con anclaje de GPI de tipo natural de PH20. Por ejemplo, los polipéptidos de esPH20 humana proporcionados en el presente documento pueden presentar actividad hialuronidasa que es el 1%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, el 110%, el 120%, el 130%, el 140%, el 150%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500%, el 1000% o más de la actividad hialuronidasa presentada por la forma con anclaje de GPI de tipo natural. En algunos ejemplos, los polipéptidos de esPH20 humana presentan actividad hialuronidasa activa neutra disminuida en comparación con la forma con anclaje de GPI de tipo natural. La actividad hialuronidasa activa neutra puede estar disminuida en el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o más en comparación con la actividad hialuronidasa activa neutra de la forma con anclaje de GPI de tipo natural. En otros ejemplos, los polipéptidos de esPH20 humana presentan actividad hialuronidasa activa neutra aumentada en comparación con la forma con anclaje de GPI de tipo natural. La actividad hialuronidasa activa neutra puede estar aumentada en el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, el 110%, el 120%, el 130%, el 140%, el 150%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500%, el 1000% o más en comparación con la actividad hialuronidasa activa neutra de la forma con anclaje de GPI de tipo natural.

Normalmente, los polipéptidos de esPH20 humana se producen usando sistemas de expresión de proteínas que facilitan la N-glicosilación correcta para garantizar que el polipéptido conserva la actividad, ya que la glicosilación es importante para la actividad catalítica y estabilidad de estos polipéptidos. Las células a modo de ejemplo útiles para la expresión recombinante de polipéptidos de esPH20 incluyen, por ejemplo células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo células DG44 CHO o CHO-S).

40 2. Polipéptidos de esPH20 de otras especies

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 soluble extendida no humana. Un experto en la técnica puede alinear la secuencia de aminoácidos de PH20 humana con cualquier polipéptido de PH20 no humana para identificar posiciones correspondientes a las posiciones 491-500 del polipéptido de PH20 humana expuesto en SEQ ID NO: 107, y en el que pueden realizarse truncamientos C-terminales para producir polipéptidos de PH20 soluble extendida. Adicionalmente, pueden usarse algoritmos, tales como los descritos en otra parte en el presente documento, para predecir la ubicación de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. La solubilidad de los polipéptidos truncados en el extremo C-terminal puede evaluarse usando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo los ensayos de Triton® X-114 descritos más adelante y en el ejemplo 4, para determinar si los polipéptidos truncados en el extremo C-terminal producidos son solubles y, por tanto, polipéptidos de esPH20.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 soluble extendida de especies de primates no humanos. Los polipéptidos de PH20 con anclaje de GPI de primates no humanos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, PH20 de chimpancé (SEQ ID NO: 197). Por tanto, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de esPH20 de chimpancé. Los polipéptidos de esPH20 de chimpancé proporcionados en el presente documento contienen truncamientos C-terminales que corresponden a los truncamientos C-terminales descritos anteriormente para los polipéptidos de esPH20 humana. Por tanto, los polipéptidos de esPH20 de chimpancé proporcionados en el presente documento contienen aminoácidos correspondientes a los residuos de aminoácido 1 a 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 ó 501 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 107.

Los polipéptidos de PH20 de chimpancé pueden alinearse con polipéptido de PH20 humana mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Tales métodos normalmente maximizan las coincidencias, e incluyen métodos tales como el uso de alineaciones manuales y usando los numerosos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP) y otros conocidos por los expertos en la técnica. La figura 1 proporciona una alineación de los polipéptidos precursores de PH20 de humano y chimpancé. Los residuos de aminoácido 491 a 500

de la PH20 humana (en los que los polipéptidos de esPH20 humana proporcionados en el presente documento están truncados en comparación con el polipéptido de PH20 humana de tipo natural) corresponden a los residuos de aminoácido 491 a 501 de PH20 de chimpancé. Por tanto, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de esPH20 de chimpancé que contienen los residuos de aminoácido 1 a 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 ó 501 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 197. Cuando se expresan en un sistema de expresión de mamífero, el péptido señal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y se secreta la forma madura de la proteína. Por tanto, los polipéptidos de esPH20 de chimpancé maduros contienen los aminoácidos 36 a 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 ó 501 de SEQ ID NO: 197.

Los polipéptidos de esPH20 de chimpancé a modo de ejemplo son los que contienen los residuos de aminoácido 1 a 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497 ó 498 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 197. Cuando se expresa en un sistema de expresión de mamíferos, el péptido señal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y se secreta la forma madura de la proteína. Por tanto, los polipéptidos de esPH20 de chimpancé maduros contienen los aminoácidos 36 a 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497 ó 498 de SEQ ID NO: 197.

D. Polipéptidos de PH20 parcialmente N-glicosilados

Se proporcionan en el presente documento hialuronidasas parcialmente N-glicosiladas, incluyendo polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados, que conservan toda o una parte de la actividad hialuronidasa de una hialuronidasa N-glicosilada. Las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas a modo de ejemplo incluyen polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados de cualquier especie, tales como cualquiera expuesto en cualquiera de SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 y 198, o variantes alélicas u otras variantes de los mismos. Un experto en la técnica conoce variantes alélicas y otras variantes, e incluyen polipéptidos que tienen una identidad de secuencia del 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95% o más con cualquiera de SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 y 198, o formas truncadas de los mismos. Las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas proporcionadas en el presente documento también incluyen hialuronidasas parcialmente desglicosiladas híbridas, de fusión y quiméricas, y conjugados de hialuronidasas parcialmente desglicosiladas.

Las hialuronidasas parcialmente N-glicosiladas proporcionadas en el presente documento pueden producirse mediante digestión con una o más glicosidasas. Por tanto, aunque todos los sitios de glicosilación con unión a N (tales como, por ejemplo, aquellos en los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humana, ejemplificados en SEQ ID NO: 107) pueden estar glicosilados, el grado de glicosilación se reduce en comparación con una hialuronidasa que no se digiere con una o más glicosidasas. Los polipéptidos de hialuronidasa parcialmente desglicosilada proporcionados en el presente documento, incluyendo polipéptidos de PH20 soluble parcialmente desglicosilada, pueden tener el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada. 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 de SEQ ID NO: 107 están parcialmente desglicosilados, de manera que ya no contienen glicanos de tipo complejo o de tipo de alto contenido en manosa, sino que más bien contienen al menos un resto N-acetilglucosamina. En algunos ejemplos, 1, 2 ó 3 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166 y N254 de SEQ ID NO: 107 están desglicosilados, es decir, no contienen un resto de 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 de SEQ ID NO: 107 están glicosilados. Los residuos de aminoácido glicosilados contienen mínimamente un resto N-acetilglucosamina.

También se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente N-glicosilados. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados proporcionados en el presente documento carecen de uno o más aminoácidos del extremo C-terminal de un polipéptido de PH20 de longitud completa, tal como cualquiera de los expuestos en SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 y 198. Por tanto, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente N-glicosilados proporcionados en el presente documento pueden estar truncados en el extremo C-terminal en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo natural de longitud completa, tal como un polipéptido de tipo natural de longitud completa con una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 y 198. En algunos ejemplos, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107 están glicosilados. Los residuos de aminoácido glicosilados contienen mínimamente un resto N-acetilglucosamina. En otros ejemplos, 1, 2 ó 3 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107 no están glicosilados. En ejemplos adicionales, el grado de glicosilación puede reducirse, de manera que los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente glicosilados no contienen glicanos de tipo complejo y de tipo de alto contenido en manosa, más bien contienen al menos un resto N-acetilglucosamina, siempre que conserven la actividad hialuronidasa. Por tanto, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados proporcionados en el presente documento pueden tener el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% del nivel de glicosilación de un polipéptido de PH20 truncado en el extremo C-terminal completamente glicosilado.

Los polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados y polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal proporcionados en el presente documento conservan la actividad hialuronidasa. Adicionalmente, los polipéptidos de

PH20 parcialmente desglicosilados y polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal son activos neutros, es decir, conservan la actividad hialuronidasa a pH neutro. La actividad hialuronidasa puede aumentar o disminuir en comparación con los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal y de longitud completa glicosilados. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados y polipéptidos de PH20 truncados en el extremo

5 C-terminal proporcionados en el presente documento pueden presentar actividad hialuronidasa que es el 1%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, el 110%, el 120%, el 130%, el 140%, el 150%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500%, el 1000% o más de la actividad hialuronidasa presentada por los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal y de longitud completa glicosilados.

10 Por tanto, los polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento pueden usarse como polipéptidos terapéuticos, tal como para tratar enfermedades o estados asociados a hialuronano. Los polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados y polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal también pueden usarse, por ejemplo, en terapia de combinación.

15 1. Polipéptidos de PH20

Las hialuronidasas parcialmente N-glicosiladas a modo de ejemplo proporcionadas en el presente documento incluyen polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados de cualquier especie, tales como cualquier expuesto en cualquiera de SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 y 198, o variantes alélicas u otras variantes de los mismos. Un experto en la técnica conoce variantes alélicas y otras variantes, e incluyen polipéptidos que tienen una identidad de secuencia del 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95% o más con cualquiera de SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 y 198, o formas truncadas de los mismos. En algunos ejemplos, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107 están glicosilados. En otros ejemplos, 1, 2 ó 3 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166 y N254 de SEQ ID NO: 107 no están glicosilados. En algunos ejemplos, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107 contienen mínimamente un resto N-acetilglucosamina.

Las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas proporcionadas en el presente documento pueden producirse mediante digestión con una o más glicosidasas. Por tanto, aunque todos los sitios de glicosilación con unión a N (tales como, por ejemplo, aquellos en los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humana, ejemplificados en SEQ ID NO: 107) pueden estar glicosilados, el grado de glicosilación se reduce en comparación con una hialuronidasa que no se digiere con una o más glicosidasas. En particular, las hialuronidasas parcialmente glicosiladas conservan al menos un resto N-acetilglucosamina en cada uno de los sitios de glicosilación con unión a N. Las hialuronidasas parcialmente glicosiladas pueden estar glicosiladas en 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de SEQ ID NO: 107. En algunos ejemplos, las hialuronidasas están desglicosiladas en 1, 2 ó 3 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los residuos de aminoácido N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107. Los polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados proporcionados en el presente documento pueden tener el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada.

Las glicosidasas, o glicósido hidrolasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico generando dos azúcares más pequeños. Tal como se muestra en la figura 2, los tipos principales de N-glicanos en vertebrados incluyen glicanos con alto contenido en manosa, glicanos híbridos y glicanos complejos. Hay varias glicosidasas que dan como resultado sólo desglicosilación parcial de proteínas, incluyendo: EndoF1, que escinde glicanos de tipo híbrido y con alto contenido en manosa; EndoF2, que escinde glicanos de tipo complejo biantenarios; EndoF3, que escinde glicanos complejos biantenarios y más ramificados; y EndoH, que escinde glicanos de tipo híbrido con alto contenido en manosa (figura 3). El tratamiento de una hialuronidasa, tal como una hialuronidasa soluble, tal como una PH20 soluble, con una o todas de estas glicosidasas da como resultado sólo una desglicosilación parcial y, por tanto, conservación de la actividad hialuronidasa.

Por ejemplo, el tratamiento de rHuPH20 con una o todas de estas glicosidasas da como resultado desglicosilación parcial. Estos polipéptidos de rHuPH20 parcialmente desglicosilados presentan actividad enzimática hialuronidasa que es comparable a los polipéptidos completamente glicosilados (véase por ejemplo el ejemplo 7). En cambio, el tratamiento de rHuPH20 (SEQ ID NO: 122) con PNGasaF, una glicosidasa que escinde todos los N-glicanos (véase la figura 3), o el tratamiento con el inhibidor de GlcNAc fosfotransferasa (GPT) tunicamicina, da como resultado la desglicosilación completa de todos los N-glicanos y de ese modo hace que PH20 sea enzimáticamente inactiva (véanse, por ejemplo, los ejemplos 7-8, a continuación).

Los polipéptidos de hialuronidasa parcialmente desglicosilados proporcionados en el presente documento, incluyendo polipéptidos de PH20 soluble parcialmente desglicosilados, pueden tener el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada. Normalmente, las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas, incluyendo polipéptidos de PH20 soluble parcialmente desglicosilados, proporcionados en el presente documento presentan actividad hialuronidasa que es el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, el 110%, el 120%, el 130%, el

140%, el 150%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500%, el 1000% o más de la actividad hialuronidasa presentada por la hialuronidasa completamente glicosilada.

5 Las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas proporcionadas en el presente documento también incluyen hialuronidasas parcialmente desglicosiladas híbridas, de fusión y quiméricas, y conjugados de hialuronidasas parcialmente desglicosiladas.

2. Polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal

10 Péptidos de PH20 parcialmente N-glicosilados, o parcialmente desglicosilados, proporcionados a modo de ejemplo en el presente documento son polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente glicosilados proporcionados en el presente documento carecen de uno o más aminoácidos del extremo C-terminal del polipéptido de PH20 de longitud completa tal como se expone en SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 y 198. Por tanto, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal
15 parcialmente glicosilados proporcionados en el presente documento pueden estar truncados en el extremo C-terminal en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo natural de longitud completa, tal como un polipéptido de tipo natural de longitud completa con una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 y 198. En algunos ejemplos, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación, correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107, están glicosilados. En otros ejemplos, 1, 2 ó 3 de los sitios de N-glicosilación, correspondientes a los aminoácidos N82, N166 y N254 de SEQ ID NO: 107, no están glicosilados.

25 Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente glicosilados proporcionados en el presente documento pueden producirse mediante digestión con una o más glicosidasas. Aunque todos los sitios de glicosilación con unión a N (tales como, por ejemplo, aquellos en los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humana, ejemplificados en SEQ ID NO: 107) pueden estar glicosilados, el grado de glicosilación se reduce en comparación con una hialuronidasa que no se digiere con una o más glicosidasas. Por tanto, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados proporcionados en el presente documento pueden tener el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada. En particular, las hialuronidasas parcialmente N-glicosiladas conservan al menos un resto N-acetilglucosamina en cada uno de los sitios de glicosilación con unión a N. En algunos ejemplos, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107 contienen mínimamente un resto N-acetilglucosamina. 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 de SEQ ID NO: 107 están glicosilados al nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada en cada uno de los 3, 4, 5 ó 6 sitios de N-glicosilación. En ejemplos adicionales, 1, 2 ó 3 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107 están completamente desglicosilados. En estos ejemplos, normalmente, los aminoácidos N82, N166 o N254 están completamente desglicosilados.

40 Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente N-glicosilados a modo de ejemplo son de cualquier especie, tales como cualquiera expuesto en cualquiera de SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 y 198, o variantes alélicas u otras variantes de los mismos. Un experto en la técnica conoce variantes alélicas y otras variantes, e incluyen polipéptidos que tienen una identidad de secuencia del 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95% o más con cualquiera de SEQ ID NO: 107-120, 197 y 198, o formas truncadas de los mismos. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente N-glicosilados proporcionados en el presente documento también incluyen polipéptidos de PH20 híbridos, de fusión y quiméricos, y conjugados de PH20. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados proporcionados en el presente documento pueden estar conjugados con un polímero, tal como dextrano, un polietilenglicol (pegilación (PEG)) o resto sialilo, u otros polímeros de este tipo, tales como polímeros naturales o de azúcar. En otros ejemplos, el polipéptido de PH20 truncado en el extremo C-terminal parcialmente N-glicosilado está unido o fusionado a un dominio tal como un dominio Fc de una inmunoglobulina IgG.

55 Se incluyen entre los polipéptidos truncados en el extremo C-terminal glicosilados o parcialmente glicosilados proporcionados en el presente documento los que están truncados en el extremo C-terminal en de 2 aminoácidos hasta 44 aminoácidos en comparación con PH20 de tipo natural expuesta en SEQ ID NO: 107 (polipéptido precursor) o 108 (polipéptido maduro o variante alélica o de especies de la misma. Por tanto, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal incluyen cualquiera que tenga truncamientos C-terminales para generar polipéptidos que contienen del aminoácido 1 al aminoácido 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 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, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506 ó 507 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 107, o posiciones correspondientes en una variante alélica o de especie de los mismos, con 2, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación, correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107, glicosilados. Cuando se expresa en células de mamífero, la secuencia señal N-terminal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y se secreta la forma madura de la proteína. Por tanto, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 truncados

5 en el extremo C-terminal maduros que contienen los aminoácidos 36 a 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 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, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506 ó 507 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 107 o posiciones correspondientes en una variante alélica o de especie de los mismos, con 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación, correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107, glicosilados.

10 La tabla 2 proporciona ejemplos no limitativos de polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal a modo de ejemplo que pueden estar glicosilados o parcialmente desglicosilados. En la tabla 2 a continuación, se proporcionan la longitud (en aminoácidos) de los polipéptidos precursores y maduros, y el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el que se exponen secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo de los polipéptidos precursores y maduros de las proteínas PH20 truncadas en el extremo C-terminal. El polipéptido de PH20 de tipo natural también se incluye en la tabla 2 para comparación.

15 Tabla 2. Polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal a modo de ejemplo

| Polipéptido | Precursor (aminoácidos) | Precursor SEQ ID NO | Maduro (aminoácidos) | Maduro SEQ ID NO |
|-------------|-------------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| SPAM1-VASL | 509 | 1 | 474 | 108 |
| SPAM1-SSVA | 507 | 3 | 472 | 55 |
| SPAM1-ISSV | 506 | 45 | 471 | 97 |
| SPAM1-IISS | 505 | 4 | 470 | 56 |
| SPAM1-LIIS | 504 | 46 | 469 | 98 |
| SPAM1-FLII | 503 | 5 | 468 | 57 |
| SPAM1-LFLI | 502 | 47 | 467 | 99 |
| SPAM1-ILFL | 501 | 6 | 466 | 58 |
| SPAM1-SILF | 500 | 48 | 465 | 100 |
| SPAM1-VSIL | 499 | 7 | 464 | 59 |
| SPAM1-IVSI | 498 | 49 | 463 | 101 |
| SPAM1-FIVS | 497 | 8 | 462 | 60 |
| SPAM1-MFIV | 496 | 50 | 461 | 102 |
| SPAM1-TMFI | 495 | 9 | 460 | 61 |
| SPAM1-ATMF | 494 | 51 | 459 | 103 |
| SPAM1-SATM | 493 | 10 | 458 | 62 |
| SPAM1-LSAT | 492 | 52 | 457 | 104 |
| SPAM1-TLSA | 491 | 11 | 456 | 63 |
| SPAM1-PSTL | 489 | 12 | 454 | 64 |
| SPAM1-STLS | 490 | 13 | 455 | 65 |
| SPAM1-SPST | 488 | 53 | 453 | 105 |
| SPAM1-ASPS | 487 | 14 | 452 | 66 |
| SPAM1-NASP | 486 | 54 | 451 | 106 |
| SPAM1-YNAS | 485 | 15 | 450 | 67 |
| SPAM1-FYNA | 484 | 16 | 449 | 68 |
| SPAM1-IFYN | 483 | 17 | 448 | 69 |
| SPAM1-QIFY | 482 | 18 | 447 | 70 |
| SPAM1-PQIF | 481 | 19 | 446 | 71 |
| SPAM1-EPQI | 480 | 20 | 445 | 72 |
| SPAM1-EEPQ | 479 | 21 | 444 | 73 |
| SPAM1-TEEP | 478 | 22 | 443 | 74 |
| SPAM1-ETEE | 477 | 23 | 442 | 75 |
| SPAM1-METE | 476 | 24 | 441 | 76 |
| SPAM1-PMET | 475 | 25 | 440 | 77 |
| SPAM1-PPME | 474 | 26 | 439 | 78 |
| SPAM1-KPPM | 473 | 27 | 438 | 79 |
| SPAM1-LKPP | 472 | 28 | 437 | 80 |
| SPAM1-FLKP | 471 | 29 | 436 | 81 |
| SPAM1-AFLK | 470 | 30 | 435 | 82 |
| SPAM1-DAFL | 469 | 31 | 434 | 83 |
| SPAM1-IDAF | 468 | 32 | 433 | 84 |
| SPAM1-CIDA | 467 | 33 | 432 | 85 |
| SPAM1-VCID | 466 | 34 | 431 | 86 |
| SPAM1-GVCI | 465 | 35 | 430 | 87 |
| SPAM1-GDVC | 464 | 36 | 429 | 88 |

| | | | | |
|------------|-----|----|-----|----|
| SPAM1-IADG | 462 | 37 | 427 | 89 |
| SPAM1-VCIA | 460 | 38 | 425 | 90 |
| SPAM1-VDVC | 458 | 39 | 423 | 91 |
| SPAM1-DAVD | 456 | 40 | 421 | 92 |
| SPAM1-DTDA | 454 | 41 | 419 | 93 |
| SPAM1-VKDT | 452 | 42 | 417 | 94 |
| SPAM1-ADVК | 450 | 43 | 415 | 95 |

Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal N-glicosilados y parcialmente desglicosilados proporcionados en el presente documento incluyen los que son solubles, es decir se reparten en la fase acuosa de una disolución de Triton® X-114, y los que son insolubles, es decir se reparten en la fase de detergente de una disolución de Triton® X-114. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados proporcionados en el presente documento pueden tener el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada. Alternativamente, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados pueden tener 1, 2 ó 3 de los sitios de N-glicosilación, correspondientes a los aminoácidos N82, N166 y N254 de SEQ ID NO: 107, que no están glicosilados. Mínimamente, para que esté glicosilado, un sitio de N-glicosilación contiene al menos un resto N-acetilglucosamina.

En algunos ejemplos, los polipéptidos truncados en el extremo C-terminal parcialmente N-glicosilados proporcionados en el presente documento son solubles, es decir, no tienen anclaje de GPI. Esto puede evaluarse, por ejemplo, usando un ensayo de Triton® X-114 tras la incubación con PI-PLC o PI-PLD, tal como se describe más adelante y en el ejemplo 4. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 que están truncados en el extremo C-terminal en o en 5' con respecto a la posición de aminoácido correspondiente a la posición de residuo de aminoácido 490 del polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 107 normalmente son solubles cuando se expresan en un sistema de expresión de mamíferos (véase, por ejemplo, el ejemplo 3). Estos polipéptidos son solubles en virtud del hecho de que carecen completamente de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI. En otros ejemplos, los polipéptidos truncados en el extremo C-terminal parcialmente glicosilados proporcionados en el presente documento son insolubles y están unidos a la membrana cuando se expresan en un sistema de expresión de mamíferos. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 que están truncados en el extremo C-terminal en o en 3' de la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 500 del polipéptido de PH20 expuesto en SEQ ID NO: 107 normalmente son insolubles cuando se expresan en un sistema de expresión de mamíferos (véase, por ejemplo el ejemplo 3). Los polipéptidos truncados en el extremo C-terminal proporcionados en el presente documento pueden estar parcialmente glicosilados porque 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107 están glicosilados.

Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente glicosilados solubles proporcionados en el presente documento incluyen los que están truncados pero conservan al menos uno o más residuos de aminoácido ubicados en la señal de unión a anclaje de GPI, y los que carecen completamente de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI y el sitio ω . Por tanto, en lugar de tener un anclaje de GPI unido covalentemente al extremo C-terminal de la proteína en el RE y estar anclado al lado extracelular de la membrana plasmática, estos polipéptidos se secretan. Estos polipéptidos de PH20 soluble truncados en el extremo C-terminal pueden estar parcialmente glicosilados de manera que 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación están glicosilados. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal solubles a modo de ejemplo que carecen de la secuencia señal de unión a anclaje de GPI son de cualquier especie, tal como cualquiera expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 y 198, o variantes alélicas u otras variantes de los mismos. Estos polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal solubles parcialmente glicosilados tienen truncamientos C-terminales para generar polipéptidos que contienen los aminoácidos 1 a 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 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 SEQ ID NO: 107. Tras la escisión de la secuencia señal N-terminal tras la expresión en células de mamífero, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal solubles parcialmente glicosilados maduros contienen los aminoácidos 36 a 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 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 SEQ ID NO: 107. En algunos ejemplos, los polipéptidos de PH20 soluble truncados en el extremo C-terminal con secuencia señal de anclaje de GPI están parcialmente glicosilados, conteniendo, por ejemplo, al menos una N-acetilglucosamina en 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107. En otros ejemplos, los polipéptidos de PH20 soluble truncados en el extremo C-terminal con secuencia señal de anclaje de GPI tienen el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada.

Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados que conservan al menos un aminoácido en la secuencia señal de unión a anclaje de GPI proporcionados en el presente documento son polipéptidos de PH20 soluble extendida parcialmente desglicosilados. En algunos ejemplos, los polipéptidos de

PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados no están glicosilados en 1, 2 ó 3 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166 y N254 de SEQ ID NO: 107. Estos polipéptidos de PH20 soluble extendida parcialmente desglicosilados contienen los aminoácidos 1 a 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 ó 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 107. Cuando se expresan en células de mamífero, la secuencia señal N-terminal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y se secreta la forma madura de la proteína. Por tanto, la forma madura de los polipéptidos de esPH20 parcialmente desglicosilados contiene los aminoácidos 36 a 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 ó 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 107. Las formas maduras de los polipéptidos de esPH20 parcialmente glicosilados proporcionados en el presente documento incluyen las expuestas en SEQ ID NO: 59-63 y 100-104 que contienen al menos una N-acetilglucosamina en 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107. En algunos ejemplos, el grado de glicosilación se reduce mediante tratamiento con una endoglicosidasa. Por tanto, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados que contienen al menos un aminoácido en la secuencia señal de unión a anclaje de GPI proporcionados en el presente documento pueden tener el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada.

También se proporcionan en el presente documento polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados que no son solubles, es decir, están unidos a la membrana celular y por tanto no se secretan al medio tras su expresión. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal que no son solubles pueden estar parcialmente desglicosilados siempre que conserven la actividad hialuronidasa. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal maduros parcialmente glicosilados que no son solubles son los que contienen los aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácido 36 a 501, 502, 503, 504, 505, 506 ó 507 de SEQ ID NO: 107. Por tanto, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente glicosilados proporcionados en el presente documento que no son solubles incluyen los que tienen 466, 467, 468, 469, 470, 471 ó 472 aminoácidos de longitud, tales como los expuestos en SEQ ID NO: 55-58 y 97-99, que conservan al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada. En algunos ejemplos, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107 están glicosilados. En otros ejemplos, los 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de N-glicosilación, correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107, contienen al menos un resto N-acetilglucosamina.

Los polipéptidos truncados en el extremo C-terminal parcialmente glicosilados proporcionados en el presente documento pueden presentar actividad hialuronidasa que está aumentada o disminuida en comparación con la forma con anclaje de GPI de tipo natural de la PH20. Adicionalmente, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente desglicosilados son activos neutros, es decir, conservan la actividad hialuronidasa a pH neutro. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal proporcionados en el presente documento pueden presentar actividad hialuronidasa que es el 1%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, el 110%, el 120%, el 130%, el 140%, el 150%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500%, el 1000% o más de la actividad hialuronidasa presentada por la forma con anclaje de GPI de tipo natural. En algunos ejemplos, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal parcialmente glicosilados presentan actividad hialuronidasa aumentada en comparación con la forma con anclaje de GPI de tipo natural.

Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal proporcionados en el presente documento también pueden estar N-glicosilados. Las hialuronidasas N-glicosiladas y parcialmente N-glicosiladas proporcionadas en el presente documento también incluyen hialuronidasas N-glicosiladas y parcialmente desglicosilasas híbridas, de fusión y quiméricas, y conjugados de hialuronidasas N-glicosiladas y parcialmente desglicosiladas.

3. Modificaciones adicionales

Los polipéptidos de PH20 incluidos en el presente documento, incluyendo polipéptidos de esPH20 humana, polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal N-glicosilados y parcialmente N-glicosilados y polipéptidos de PH20 parcialmente glicosilados, también incluyen los que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y los que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, sialilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica. Por tanto, los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal, incluyendo polipéptidos de esPH20, proporcionados en el presente documento pueden contener otras modificaciones que están o no están en la secuencia primaria del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, de un resto de hidrato de carbono, un resto de polietilenglicol (PEG), un resto de sialilación, un dominio Fc de inmunoglobulina G, o cualquier otro dominio o resto. Por ejemplo, tales modificaciones adicionales pueden hacerse para aumentar la estabilidad o semivida en suero de la proteína. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal, incluyendo polipéptidos de esPH20, proporcionados en el presente documento pueden estar conjugados o fusionados a cualquier resto usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos químicos y recombinantes, siempre que el polipéptido resultante conserve la actividad hialuronidasa.

Disminución de la inmunogenicidad

Los polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento, incluyendo los polipéptidos de esPH20 humana, pueden prepararse para que tengan una disminución de la inmunogenicidad. La disminución de la inmunogenicidad puede efectuarse mediante cambios de secuencia que eliminan epítopos antigénicos del polipéptido o alterando modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, se contempla la alteración de la glicosilación del péptido, siempre que los polipéptidos contengan mínimamente al menos N-acetilglucosamina en los residuos de aminoácido N235, N368 y N393 de SEQ ID NO: 107.

Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 pueden modificarse de manera que carezcan de fucosa, particularmente bifucosilación. En particular, los polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento no están bifucosilados. Esto puede lograrse expresando y produciendo el polipéptido de PH20 en una célula huésped, normalmente células huésped de insecto, que no efectúan bifucosilación. La fucosa es una desoxihexosa que está presente en una amplia variedad de organismos, incluyendo mamíferos, insectos y plantas. Los glicanos fucosilados se sintetizan por fucosil-transferasas. Véanse, por ejemplo, Ma *et al.*, *Glycobiology*, 15(2):158R-184R, (2006); Nakayama *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:16100-16106 (2001); y Sturla *et al.*, *Glycobiology*, 15(10):924-935 (2005). En humanos, la fucosa existe frecuentemente como modificación terminal en estructuras de glicano, y se ha mostrado que la presencia de fucosa unida en α 1,6 a N-acetilglucosamina es importante en el procesamiento y el reconocimiento de glicoproteínas. En insectos, las estructuras de núcleo de N-glicano presentan bifucosilación con uniones α 1,6 y α 1,3. La fucosilación de núcleos en células de insecto con uniones α 1,3 genera un epítipo de hidrato de carbono que es inmunogénico en humanos (véase, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense n.º 20070067855). Por ejemplo, pueden generarse polipéptidos de PH20 proporcionados en el presente documento, incluyendo polipéptidos de esPH20, en células huésped que no pueden bifucosilar el polipéptido. Por tanto, aunque pueden usarse células de insecto u otras células que bifucosilan para la expresión de los polipéptidos, normalmente se usan células de mamífero, tales como células CHO.

En algunos ejemplos, pueden generarse polipéptidos de PH20 defucosilados, o deficientes en fucosa en células de insecto con rutas de glicosilación modificadas, a través del uso de vectores de expresión de baculovirus que contienen genes de procesamiento de oligosacáridos eucariotas, creando de ese modo sistemas de expresión de células de insecto "mamiferizadas" (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.461.863). Alternativamente, puede eliminarse la antigenicidad mediante la expresión de polipéptidos de PH20 en células de insecto que carecen de α 1,3-fucosiltransferasa (FT3) (véase, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense n.º 20070067855). En otros ejemplos, pueden generarse polipéptidos de PH20 defucosilados o deficientes en fucosa, por ejemplo, en líneas celulares que producen proteínas defucosiladas, incluyendo células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0157108; y documento WO 2004/056312), y líneas celulares deficientes, tales como células CHO deficientes en el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8 (Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Conjugación con polímeros

En algunos ejemplos, los polipéptidos de esPH20 y otros polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal, incluyendo polipéptidos de PH20 parcialmente glicosilados, proporcionados en el presente documento están conjugados con polímeros. Los polímeros a modo de ejemplo que pueden conjugarse con los polipéptidos de PH20 incluyen homopolímeros naturales y sintéticos, tales como polioles (es decir poli-OH), poliaminas (es decir poli-NH₂) y ácidos policarboxílicos (es decir poli-COOH), y heteropolímeros adicionales, es decir polímeros que comprenden uno o más grupos de acoplamiento diferentes por ejemplo un grupo hidroxilo y grupos amina. Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas de entre poli(óxidos de alquileo) (PAO), tales como polialquilenglicoles (PAG), incluyendo polietilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, PEG-glicidil éteres (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), polietilenglicoles ramificados (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli-D,L-aminoácidos, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, dextranos incluyendo carboximetil-dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, hidrolizados de quitosano, almidones tales como hidroxietil-almidones e hidroxipropil-almidones, glucógeno, agarosas y derivados de los mismos, goma guar, pululano, inulina, goma xantana, carragenanos, pectina, hidrolizados de ácido algínico y biopolímeros.

Normalmente, los polímeros son poli(óxidos de alquileo) (PAO), tales como poli(óxidos de etileno), tales como PEG, normalmente mPEG, que, en comparación con polisacáridos tales como dextrano, pululano y similares, tienen pocos grupos reactivos que puedan reticularse. Normalmente, los polímeros son moléculas poliméricas no tóxicas tales como (metoxi)polietilenglicol (mPEG) que pueden conjugarse covalentemente con los polipéptidos de esPH20 y otros polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal (por ejemplo, con grupos de unión en la superficie de la proteína) usando una química relativamente sencilla.

Las moléculas poliméricas adecuadas para la unión a los polipéptidos de esPH20 y otros polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG tales como metoxipolietilenglicoles (mPEG), PEG-glicidil éteres (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), PEG ramificados y poli(óxido de etileno) (PEO) (véanse por ejemplo Roberts *et al.*, *Advanced Drug Delivery Review* 2002,

54: 459-476; Harris y Zalipsky (eds.) "Poly(ethylen glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar *et al.*, J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 3(1):125-136, 2000; Harris y Chess (2003) Nat Rev Drug Discov. 2(3):214-21; y Tsubery, J Biol. Chem 279(37):38118-24, 2004). La molécula polimérica puede ser de un peso molecular que oscila normalmente entre aproximadamente 3 kDa y aproximadamente 60 kDa. En algunas realizaciones la molécula polimérica que se conjuga con un polipéptido de PH20 proporcionado en el presente documento tiene un peso molecular de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más de 60 kDa.

Se conocen en la técnica diversos métodos de modificación de polipéptidos uniendo covalentemente (conjugando) un PEG o derivado de PEG (es decir "pegilación") (véanse, por ejemplo, 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, ligadores especializados y químicas de acoplamiento (véase, por ejemplo, Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54:459-476, 2002), unión de múltiples restos de PEG a un único sitio de conjugación (tal como mediante el uso de PEG ramificados; véase, por ejemplo, Veronese *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:177-180, 2002), monopegilación y/o pegilación específica de sitio (véase, por ejemplo, Chapman *et al.*, Nature Biotech. 17:780-783, 1999), y pegilación enzimática dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 54:487-504, 2002) (véanse también, por ejemplo, Lu y Felix (1994) Int. J. Peptide Protein Res. 43:127-138; Lu y Felix (1993) Peptide Res. 6:142-6, 1993; Felix *et al.* (1995) Int. J. Peptide Res. 46:253-64; Benhar *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269:13398-404; Brumeau *et al.* (1995) J Immunol. 154:3088-95; véanse también, Caliceti *et al.* (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10):1261-77 y Molineux (2003) Pharmacotherapy 23 (8 Pt 2):3S-8S). Los métodos y las técnicas 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, por ejemplo, el documento U.S. 2006/0104968).

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), succinimidil-mPEG, mPEG2-N-hidroxisuccinimida, alfa-metilbutanoato de mPEG-succinimidilo, propionato de mPEG-succinimidilo, butanoato de mPEG-succinimidilo, éster succinimidílico del ácido mPEG-carboximetil-3-hidroxi-butanoico, propionato de PEG-succinimidilo homobifuncional, PEG-propionaldehído homobifuncional, PEG-butilaldehído homobifuncional, PEG-maleimida, PEG-hidrazida, p-nitrofenil-carbonato-PEG, carbonato de mPEG-benzotriazol, propionaldehído-PEG, mPEG-butilaldehído, mPEG2-butilaldehído ramificado, mPEG-acetilo, mPEG-piperidona, mPEG-metilcetona, mPEG-maleimida "sin ligador", mPEG-vinilsulfona, mPEG-tiol, mPEG-ortopiridiltioéster, mPEG-ortopiridildisulfuro, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona-PEG-NHS, acrilato-PEG-NHS, fluoresceína-PEG-NHS y biotina-PEG-NHS (véanse, por ejemplo, Monfardini *et al.*, Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Veronese *et al.*, J. Bioactive Compatible Polymers 12:197-207, 1997; los 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. 5.183.550; 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. 2005/000360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

Otras modificaciones

Los polipéptidos de esPH20 y otros polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal proporcionados en el presente documento también incluyen fusiones y conjugados de los mismos.

E. Métodos de producción de ácidos nucleicos que codifican para PH20 soluble extendida y otras hialuronidasas PH20 solubles, y polipéptidos de las mismas

Los polipéptidos de PH20 soluble extendida, hialuronidasas PH20 truncadas en el extremo C-terminal y hialuronidasas PH20 parcialmente glicosiladas expuestas en el presente documento, y moléculas de ácido nucleico que codifican para tales polipéptidos, pueden obtenerse mediante métodos bien conocidos en la técnica para la expresión de proteínas recombinantes y la purificación de proteínas. Por ejemplo, el ADN puede obtenerse a partir de ADN clonado (por ejemplo a partir de una biblioteca de ADN), mediante síntesis química, mediante clonación de ADNc, o mediante la clonación de ADN genómico o fragmentos del mismo, purificado a partir de la célula deseada. Cuando los polipéptidos se producen por medios recombinantes, puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la técnica para la identificación de ácidos nucleicos que codifican para los genes deseados. Puede usarse cualquier método disponible en la técnica para obtener un ADNc de longitud completa (es decir que engloba toda la región codificante) o ADN genómico que codifica para una enzima PH20 deseada, tal como de una fuente celular o tisular. Pueden modificarse por ingeniería genética formas modificadas o variantes, incluyendo formas truncadas tal como se proporciona en el presente documento, a partir de un polipéptido de tipo natural usando métodos de ADN recombinante convencionales.

Los polipéptidos pueden clonarse o aislarse usando cualquier métodos disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Tales métodos incluyen amplificación por PCR de ácidos nucleicos y examen

de bibliotecas, incluyendo examen de hibridación de ácido nucleico, examen basado en anticuerpos y examen basado en actividad.

5 Pueden usarse métodos para la amplificación de ácidos nucleicos para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido deseado, incluyendo por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Puede llevarse a cabo PCR usando cualquier método o procedimiento conocido en la técnica. A modo de ejemplo de tales métodos, se incluyen el uso de un termociclador Cetus de Perkin-Elmer y Taq polimerasa (Gene Amp). Puede usarse un material que contiene ácido nucleico como material de partida a partir del cual puede aislarse una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido deseado. Por ejemplo, pueden usarse preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos tisulares a partir de una fuente apropiada (por ejemplo testículos, próstata, mama), muestras de fluido (por ejemplo sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos en los métodos de amplificación. La fuente puede ser a partir de cualquier especie eucariota incluyendo, pero sin limitarse a, fuentes de vertebrados, mamíferos, humanos, porcinos, bovinos, felinos, aves, equinos, caninos y de otros primates. Pueden usarse también bibliotecas de ácido nucleico como fuente de material de partida. Pueden diseñarse cebadores para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores basándose en secuencias expresadas a partir de las cuales se genera un polipéptido deseado. Pueden diseñarse cebadores basándose en la traducción inversa de una secuencia de aminoácidos de polipéptido. Si se desea, pueden usarse cebadores degenerados para la amplificación. Pueden usarse cebadores oligonucleotídicos que se hibridan con las secuencias en los extremos 3' y 5' terminales de la secuencia deseada como cebadores para amplificar mediante secuencia de PCR a partir de una muestra de ácido nucleico. Pueden usarse cebadores para amplificar toda la PH20 de longitud completa, o una secuencia truncada de la misma, tal como un ácido nucleico que codifica para cualquiera de los polipéptidos de PH20 soluble proporcionados en el presente documento. Pueden secuenciarse las moléculas de ácido nucleico generadas mediante amplificación y confirmarse para codificar un polipéptido deseado.

25 Pueden unirse secuencias de nucleótidos adicionales a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido, incluyendo secuencias de ligador que contienen sitios de endonucleasas de restricción para el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN que codifican para la proteína de núcleo. Además, pueden unirse operativamente secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido. Los ejemplos de tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias de promotor 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 las conocen los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias señal heterólogas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, secuencias señal heterólogas de IgG kappa de humano y ratón expuestas en SEQ ID NO: 144 y 145, respectivamente. Pueden unirse también secuencias de residuos de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteínas a moléculas de ácido nucleico que codifican para una enzima. Tales regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican para proteínas que facilitan la captación de una enzima dentro de células diana específicas, o de lo contrario alteran la farmacocinética de un producto de un gen sintético.

Además, pueden añadirse etiquetas u otros restos, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, pueden unirse también secuencias de residuos de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican para una etiqueta epitópica u otro marcador detectable a moléculas de ácido nucleico que codifican para una enzima. A modo de ejemplo de tales secuencias se incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican para una etiqueta de His (por ejemplo, 6xHis, HHHHHH; SEQ ID NO: 142) o etiqueta Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 143).

Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden insertarse entonces en un vector de clonación apropiado. Puede usarse un gran número de sistemas de vector-huésped conocidos en la técnica. Los posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula huésped usada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados de plásmido pCMV4, pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ejemplificado en el presente documento (expuesto en SEQ ID NO: 140). La inserción en un vector de clonación puede lograrse, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene extremos terminales cohesivos complementarios. Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Alternativamente, puede producirse cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (ligadores) en los extremos terminales del ADN; estos ligadores ligados pueden incluir oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican para secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de la proteína pueden modificarse mediante prolongación homopolimérica. La inserción puede efectuarse usando vectores de clonación TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA).

65 Pueden introducirse moléculas recombinantes en células huésped por medio de, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generan muchas copias de la secuencia

génica. En realizaciones específicas, la transformación de células huésped 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. Por tanto, el gen puede obtenerse en grandes cantidades haciendo crecer transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

Además de la producción recombinante, puede producirse PH20 soluble, incluyendo cualquier esPH20 proporcionada en el presente documento, mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (véanse, por ejemplo, Stewart *et al.* (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J (1963) J Am Chem Soc., 85:2149-2154). Puede realizarse síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o mediante automatización. Puede lograrse la síntesis automatizada, por ejemplo, usando el sintetizador peptídico Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City CA) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Pueden sintetizarse químicamente diversos fragmentos de un polipéptido por separado y combinarse usando métodos químicos.

1. Vectores y células

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

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

Se proporcionan células procariontes y eucariotas, incluyendo células endoteliales, que contienen los vectores. Tales células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, Archea, células vegetales, células de insecto y células animales. Las células se usan para producir una proteína de las mismas haciendo crecer las células descritas anteriormente en condiciones mediante las cuales la proteína codificada se expresa por la célula, y recuperando la proteína expresada. Para fines en el presente documento, por ejemplo, pueden secretarse al medio polipéptidos de PH20 soluble, incluyendo polipéptidos de PH20 soluble extendida.

Puede elegirse una cepa de células huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada del modo deseado. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraducciona puede tener un impacto en el plegamiento y/o la función del polipéptido. Diferentes células huésped, tales como, pero sin limitarse a, CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), HeLa, MCDK, 293 y WI38 tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y pueden elegirse para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína introducida. Generalmente, la elección de la célula es una que pueda introducir glicosilación unida a N en el polipéptido expresado. Por tanto, se proporcionan células eucariotas que contienen los vectores. Células eucariotas a modo de ejemplo son células de ovario de hámster chino (CHO) de mamífero. Por ejemplo, se usan células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (por ejemplo células DG44) para producir polipéptidos proporcionados en el presente documento. Obsérvese que la expresión bacteriana de una PH20 soluble extendida o PH20 truncada en el extremo C-terminal proporcionada en el presente documento no dará como resultado un polipéptido catalíticamente activo, pero cuando se combina con la maquinaria de glicosilación apropiada, la PH20 puede glicosilarse artificialmente.

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de hialuronidasa, incluyendo polipéptidos de PH20 soluble extendida y otros polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal, acoplados a la secuencia señal nativa o heteróloga, así como múltiples copias de los mismos. Los vectores pueden seleccionarse para la expresión de la proteína enzimática en la célula o de manera que la proteína enzimática se exprese como una proteína secretada.

Puede usarse una variedad de sistemas de huésped-vector para expresar la secuencia que codifica para la proteína. Estos incluyen pero no se limitan a sistemas de células de mamífero infectadas con virus (por ejemplo virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insecto infectadas con virus (por ejemplo baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN de plásmido o ADN de cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema de huésped-vector usado, puede usarse uno cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados.

Puede usarse cualquier 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 que codifican para la proteína. Estos métodos pueden incluir ADN recombinante *in vitro* y técnicas de síntesis y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican para la proteína, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de la misma, puede regularse mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de la misma se expresan en un huésped transformado con la(s) molécula(s) de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede controlarse mediante cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En una realización específica, el promotor no es nativo para los genes para lograr una proteína deseada. Los promotores que pueden usarse incluyen pero no se limitan a el promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.* Cell 22:787-797 (1980)), el promotor de timidina cinasa de herpes (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster *et al.*, Nature 296:39-42 (1982)); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de b-lactamasa (Jay *et al.*, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543) o el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242:79-94 (1980)); vectores de expresión de plantas que contienen el promotor de nopalina sintética (Herrera-Estrella *et al.*, Nature 303:209-213 (1984)) o el promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner *et al.*, Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la enzima protosintética ribulosa bisfosfato carboxilasa (Herrera-Estrella *et al.*, Nature 310:115-120 (1984)); elementos promotores de levadura y otros hongos tal como el promotor de Gal4, el promotor de alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol cinasa, el promotor de fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional de animales que presentan especificidad de tejido y se han usado en animales transgénicos: la región de control del gen de 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 insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan *et al.*, Nature 315:115-122 (1985)), la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, Cell 38:647-658 (1984); Adams *et al.*, Nature 318:533-538 (1985); Alexander *et al.*, Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, Cell 45:485-495 (1986)), la región de control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinckert *et al.*, Genes y Devel. 1:268-276 (1987)), la región de control del gen de alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf *et al.*, Mol. Cell Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer *et al.*, Science 235:53-58 (1987)), la región de control del gen de alfa-1 antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey *et al.*, Genes y Devel. 1: 161-171 (1987)), la región de control del gen de 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 la proteína básica de la mielina que es activa en células de oligodendrocitos del cerebro (Readhead *et al.*, Cell 48:703-712 (1987)), la región de control del gen de cadena ligera 2 de la 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 gonadotrófica que es activa en gonadotrofos del hipotálamo (Mason *et al.*, Science 234:1372-1378 (1986)).

En una realización específica, se usa un vector que contiene un promotor operativamente unido a ácidos nucleicos que codifican para una proteína PH20, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo de la misma, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibiótico). Dependiendo del sistema de expresión, se requieren también señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de una secuencia de PH20. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que se insertan el codón de iniciación y secuencias en el sentido de 5' de PH20 o formas solubles de la misma en el vector de expresión apropiado, no son necesarias señales de control de la traducción adicionales. En los casos en los que sólo se inserta la secuencia codificante, o una parte de la misma, deben proporcionarse señales de control de la transcripción exógenas que incluyen el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para garantizar la transcripción de todo el inserto. Los elementos transcripcionales exógenos y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto natural como sintético. La eficacia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (Scharf *et al.* (1994) Results Probl Cell Differ 20:125-62; Bittner *et al.* (1987) Methods in Enzymol, 153:516-544).

Los vectores de plásmido a modo de ejemplo para la transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor de fago T5 (reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión de operador lac doble para proporcionar expresión de alto nivel, estrechamente regulada de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión al ribosoma sintético (RBS II) para lograr una traducción eficaz, una secuencia que codifica para etiqueta de 6xHis, terminadores de la transcripción t_0 y T1, origen de replicación ColE1 y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de una etiqueta de 6xHis en el extremo o bien N- o bien C-terminal de la proteína recombinante. Tales plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30 y pQE 31 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 de plásmido a modo de ejemplo para la transformación de células *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase la patente estadounidense 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, terminador T7, el operador lac de *E. coli* inducible y el gen represor lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, 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-Tag™ para su uso en la 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 T7-lac y el terminador T7.

Un vector a modo de ejemplo para la expresión en células de mamífero es el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 se derivó de la estructura principal del vector pCI (Promega). Contiene ADN que codifica para el gen de resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación F1, una región potenciadora/promotora temprana inmediata de citomegalovirus (CMV) y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El vector de expresión tiene también un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón. Las células transfectadas con un vector de este tipo pueden cultivarse en medio químicamente definido en ausencia de hipoxantina y timidina, seguido por amplificación génica adicional con concentraciones crecientes de metotrexato. Tales métodos se describen en el presente documento en los ejemplos 13 y 15.

2. Expresión

Pueden producirse polipéptidos de PH20, incluyendo polipéptidos de esPH20 y polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal proporcionados en el presente documento, mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica incluyendo métodos *in vivo* e *in vitro*. Pueden expresarse proteínas deseadas en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas requeridas de las proteínas, tales como por ejemplo, necesarias para la administración y el tratamiento. Los huéspedes de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insecto, células de mamífero, incluyendo líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los huéspedes de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas así como los tipos de modificación postraduccional que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del huésped de expresión puede hacerse basándose en estos y otros factores, tales como consideraciones regulatorias y de seguridad, los costes de producción y la necesidad y los métodos para la purificación.

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

Pueden utilizarse también o expresarse como fusiones de proteínas polipéptidos de hialuronidasa soluble, incluyendo esPH20, y otros polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal. Por ejemplo, puede generarse una fusión enzimática para añadir funcionalidad adicional a una enzima. Los ejemplos de proteínas de fusión enzimáticas incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia señal, una etiqueta tal como para la localización, por ejemplo una etiqueta de his₆ o una etiqueta myc, o una etiqueta para la purificación, por ejemplo, una fusión con GST, una secuencia para dirigir la secreción de proteínas y/o la asociación a la membrana y otras secuencias usadas para aumentar la semivida tal como una fusión con Fc.

Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se desea una expresión estable. Por ejemplo, pueden transformarse líneas celulares que expresan de manera estable una PH20 soluble, tal como una esPH20, u otro polipéptido de PH20 truncado en el extremo C-terminal, usando vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Tras la introducción del vector, puede permitirse que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarse a medio selectivo. El fin del marcador seleccionable es conferir resistencia para la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas. Las células resistentes de células transformadas de manera estable pueden hacerse proliferar usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para los tipos de células.

Puede usarse cualquiera de varios sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero no se limitan a, los genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler M *et al.* (1977) Cell, 11:223-32) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy I *et al.* (1980) Cell, 22:817-23), que pueden emplearse en células TK- o APRT-, respectivamente. Además, puede usarse la resistencia a antimetabolito, antibióticos o herbicidas como base para la selección. Por ejemplo, pueden usarse DHFR, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler M *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci, 77:3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglicósidos neomicina y G-418 (Colbere-Garapin F *et al.* (1981) J. Mol. Biol., 150:1-14); y als o pat, que confieren resistencia a clorsulfurón y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente. Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano o hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman SC y RC Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci, 85:8047-51). Pueden usarse también marcadores visibles, tales como pero sin limitarse a, antocianinas, beta glucuronidasa y su sustrato, GUS, y

luciferasa y su sustrato luciferina, para identificar transformantes y también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema de vector particular (Rhodes CA *et al.* (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

5 Puede monitorizarse la presencia y expresión de polipéptidos de PH20 soluble, incluyendo esPH20, y otros polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal. Por ejemplo, la detección de un polipéptido funcional puede determinarse sometiendo a prueba el medio condicionado para detectar actividad enzimática hialuronidasa en condiciones apropiadas. La sección G más adelante proporciona ensayos a modo de ejemplo para evaluar la solubilidad y actividad de proteínas expresadas.

10

a. Células procariotas

Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de proteínas. La transformación de *E. coli* es una técnica sencilla y rápida bien conocida por los expertos en la 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 presentan alguna toxicidad para las células huésped. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac híbrido, los promotores de ARN T7 y SP6 y el promotor λ PL regulado por temperatura.

15

20

Pueden expresarse proteínas, tales como cualquiera proporcionada en el presente documento, en el entorno citoplasmático de *E. coli*. El citoplasma es un entorno reductor y, para algunas moléculas, esto puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Pueden usarse agentes reductores tales como ditioneitol y β -mercaptoetanol y desnaturalizantes, tales como guanidina-HCl y urea para resolubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias, lo que proporciona un entorno oxidante y de tipo chaperonina y disulfuro isomerasas y puede conducir a la producción de proteína soluble. Normalmente, se fusiona una secuencia líder con la proteína que va a expresarse que dirige la proteína al periplasma. El líder se elimina entonces mediante peptidasas señal dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias líder de direccionamiento periplásmico incluyen el líder pelB del gen de peptidato liasa y el líder derivado del gen de fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite el escape de la proteína expresada al medio de cultivo. La secreción de proteínas permite una purificación rápida y sencilla a partir del sobrenadante de cultivo. Pueden obtenerse proteínas que no se secretan a partir del periplasma mediante lisis osmótica. Similar a la expresión citoplasmática, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y pueden usarse desnaturalizantes y agentes de reducción para facilitar la solubilización y el repliegamiento. La temperatura de inducción y el crecimiento pueden influir también en los niveles de expresión y solubilidad, se usan normalmente temperaturas de entre 25°C y 37°C. Normalmente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por tanto, si las proteínas requieren glicosilación para su función, puede añadirse glicosilación *in vitro* tras la purificación a partir de las células huésped.

25

30

35

b. Células de levadura

Levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son huéspedes de expresión de levaduras bien conocidos que pueden usarse para la producción de proteínas, tales como cualquiera descrita en el presente documento. La levadura puede transformarse con vectores de replicación episomales o mediante integración cromosómica estable mediante recombinación homóloga. Normalmente, se usan promotores inducibles para regular la expresión génica. Los ejemplos de tales promotores incluyen promotores de GAL1, GAL7 y GAL5 y metalotioneína, tales como CUP1, AOX1 u otro promotor de *Pichia* u otro de levadura. Los vectores de expresión incluyen a menudo 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 coexpresión con chaperoninas tales como Bip y proteína disulfuro isomerasa puede mejorar los niveles de expresión y la solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en levadura pueden dirigirse a la secreción usando fusiones con péptidos señal de secreción tales como la señal de secreción factor alfa de tipo acoplamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie celular de levadura tales como el receptor de adhesión de acoplamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adenivorans*. Puede introducirse por ingeniería genética un sitio de escisión de proteasa tal como para la proteasa Kex-2 para eliminar las secuencias fusionadas a partir de los polipéptidos expresados a medida que salen de la ruta de secreción. La levadura puede glicosilar también en motivos Asn-X-Ser/Thr.

40

45

50

55

c. Células de insecto

Las células de insecto, particularmente usando expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tales como polipéptidos de hialuronidasa. Las células de insecto expresan altos niveles de proteína y pueden realizar la mayoría de las modificaciones postraduccionales usadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen una gama de huéspedes restringida que mejora la seguridad y reduce los problemas regulatorios de la expresión en eucariotas. Los vectores de expresión típicos usan un promotor para la expresión a alto nivel tal como el promotor de polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus comúnmente usados incluyen los baculovirus tales como el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), y el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx*

60

65

mori (BmNPV) y una línea celular de insectos tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para la expresión a alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que va a expresarse se fusiona inmediatamente en el sentido de 3' del codón de iniciación de polihedrina del virus. Se procesan de manera precisa señales de secreción de mamíferos en células de insecto y pueden usarse para secretar la proteína expresada al medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a sistemas de células de mamíferos. Células de insecto a modo de ejemplo son las que se han alterado para reducir la inmunogenicidad, incluyendo aquellas con vectores de expresión de baculovirus "mamiferizados" y las que carecen de la enzima FT3.

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

d. Células de mamífero

Pueden usarse sistemas de expresión de mamíferos para expresar proteínas incluyendo polipéptidos de hialuronidasa soluble. Pueden transferirse constructos de expresión a células de mamífero mediante infección viral tal como adenovirus o mediante transferencia de ADN directa tal como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero incluyen normalmente un sitio de caperuza de ARNm, una caja TATA, una secuencia de inicio de la traducción (secuencia consenso Kozak) y elementos de poliadenilación. Pueden añadirse también 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 la expresión de alto nivel, por ejemplo el promotor-potenciador de SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV) humano y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (VSR). Estos promotores-potenciadores son activos en muchos tipos de células. Pueden usarse también para la expresión regiones potenciadoras y promotores de tipo tisular y celular. Las regiones promotoras/potenciadoras a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, las 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 la mielina, cadena ligera 2 de miosina y control del gen de hormona liberadora gonadotrópica. Pueden usarse 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 fosforibosil transferasa, aminoglicósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa. Por ejemplo, la expresión puede realizarse en presencia de metotrexato para seleccionar sólo las células que expresan el gen de DHFR. La fusión con moléculas de señalización de la superficie celular tales como TCR- ξ y Fc ϵ RI- γ puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo sobre la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas celulares para la expresión en mamíferos incluyendo células de ratón, rata, humano, mono, pollo y hámster. Las líneas celulares a modo de ejemplo incluyen pero no se limita a células CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretora) 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 facilita la purificación de proteínas secretadas a partir del medio de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, n.º 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 a crecer en medios especiales optimizados para lograr una expresión máxima. Por ejemplo, las células DG44 CHO están adaptadas a crecer en cultivo en suspensión en un medio químicamente definido, libre de productos animales.

e. Plantas

Pueden usarse plantas y células vegetales transgénicas para expresar proteínas tales como cualquiera descrita en el presente documento. Normalmente se transfieren constructos de expresión a plantas usando transferencia de ADN directa tal como bombardeo con microproyectiles y transferencia mediada por PEG al interior de protoplastos, y con transformación mediada por *Agrobacterium*. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias de promotor y potenciador, 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 huéspedes dicotiledóneos, tales como *Arabidopsis* y tabaco, y huéspedes monocotiledóneos, tales como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores de plantas usados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Se usan a menudo marcadores seleccionables tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa para facilitar la selección y el mantenimiento de células transformadas. Pueden mantenerse células vegetales transformadas en cultivo como células, agregados (tejido calloso) o regenerarse para dar células completas. Las células de plantas transgénicas pueden incluir también algas modificadas por ingeniería genética para producir

polipéptidos de hialuronidasa. Debido a que las plantas tienen patrones de glicosilación diferentes de las células de mamífero, esto puede influir en la elección de la proteína producida en estos huéspedes.

3. Técnicas de purificación

5 Pueden cultivarse células huésped transformadas con una secuencia de ácido nucleico que codifica para una PH20 soluble, incluyendo esPH20 y otros polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal, en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada a partir del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante se secreta generalmente, pero puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Tal como entenderán los expertos en la técnica, pueden diseñarse vectores de expresión que contienen ácido nucleico que codifica para PH20 con secuencias señal que facilitan la secreción directa de PH20 a través de la membrana celular procariota o eucariota.

15 Por tanto, el método para la purificación de polipéptidos a partir de células huésped dependerá de las células huésped y los sistemas de expresión elegidos. Para moléculas secretadas, las proteínas se purifican generalmente a partir de los medios de cultivo tras retirar las células. Para la expresión intracelular, las células pueden lisarse y las proteínas purificarse a partir del extracto. Cuando se usan para la expresión organismos transgénicos tales como plantas y animales transgénicos, pueden usarse tejidos u órganos como material de partida para preparar un extracto celular lisado. Adicionalmente, la producción en animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que pueden recogerse, y si es necesario, las proteínas pueden extraerse y purificarse adicionalmente usando métodos convencionales en la técnica.

25 Pueden purificarse proteínas, tales como polipéptidos de PH20 soluble, incluyendo polipéptidos de esPH20, u otros polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en la técnica incluyendo pero sin limitarse a, SDS-PAGE, fraccionamiento por tamaño y cromatografía de exclusión molecular, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como intercambio aniónico. Pueden utilizarse también técnicas de purificación por afinidad para mejorar la eficacia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a enzimas hialuronidasa PH20 en la purificación por afinidad. Por ejemplo, puede purificarse PH20 soluble a partir del medio condicionado.

35 Pueden modificarse también por ingeniería genética constructos de expresión para añadir una etiqueta de afinidad a una proteína tal como un epítipo myc, fusión con GST o His₆ y purificarse por afinidad con anticuerpo frente a myc, resina de glutatión y resina de Ni, respectivamente. Tales etiquetas pueden unirse a la secuencia de nucleótidos que codifica para una PH20 soluble tal como se describe en otra parte en el presente documento, lo que puede facilitar la purificación de proteínas solubles. Por ejemplo, puede expresarse PH20 soluble como una proteína recombinante con uno o más dominios de polipéptido adicionales añadidos para facilitar la purificación de la proteína. Tales dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle Wash.). La inclusión de una secuencia de ligador escindible tal como Factor XA o enterocinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y el polipéptido de PH20 expresado es útil para facilitar la purificación. Un vector de expresión de este tipo proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene una PH20 soluble y contiene ácido nucleico que codifica para 6 residuos de histidina seguido por tiorredoxina y un sitio de escisión de enterocinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación en IMIAC (cromatografía de afinidad por ión metálico inmovilizado), mientras que el sitio de escisión de enterocinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido a partir de la proteína de fusión.

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

55 Dependiendo de las células huésped y el sistema de expresión usados, el polipéptido resultante puede ser heterogéneo debido a las peptidasas presentes en el medio de cultivo tras la producción y purificación. Por ejemplo, el cultivo de PH20 soluble en células CHO puede dar como resultado una mezcla de polipéptidos heterogéneos. A continuación, se describe en los ejemplos 13-15 un protocolo a modo de ejemplo para la generación, producción y purificación de una PH20 soluble (por ejemplo rHuPH20). De manera similar, por ejemplo, la expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos 36-497 expuesta en SEQ ID NO: 60, puede dar como resultado una mezcla heterogénea de polipéptidos incluyendo de manera variable polipéptidos que terminan en 497, 496, 495, 494, 493, 492, 491, 490, 489 o más cortos.

65 F. Preparación, formulación y administración de polipéptidos de PH20 soluble extendida, y otros polipéptidos de PH20 soluble

Se proporcionan en el presente documento para la administración composiciones farmacéuticas de polipéptidos de PH20 soluble, incluyendo esPH20. Los polipéptidos de PH20 soluble pueden formularse por separado, o pueden formularse conjuntamente o administrarse conjuntamente con formulaciones farmacéuticas de otros agentes terapéuticos, por ejemplo, tal como se describe en la sección G. Los compuestos pueden formularse para dar preparaciones farmacéuticas adecuadas tales como disoluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elixires, para administración oral, así como una preparación de parche transdérmico e inhaladores de polvo seco. Normalmente, los compuestos se formulan para dar composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, cuarta edición, 1985, 126).

Normalmente, se contempla una dosificación terapéuticamente eficaz. La cantidad de una PH20 soluble seleccionada que va a administrarse para el tratamiento de una enfermedad o un estado puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosificación precisa, que puede determinarse de manera empírica, puede depender de la enzima particular, la vía de administración, el tipo de enfermedad que va a tratarse y la gravedad de la enfermedad.

Por tanto, se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función de la enfermedad que está tratándose y puede determinarse de manera empírica usando protocolos de prueba conocidos o mediante extrapolación a partir de datos de prueba *in vivo* o *in vitro*. Debe indicarse que las concentraciones y los valores de dosificación pueden variar también con la gravedad del estado que va a aliviarse. Se entiende además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o que supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son sólo a modo de ejemplo y no se pretende limitar el alcance o el uso de las composiciones y combinaciones que los contienen. Las composiciones pueden administrarse cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o sólo una vez. Generalmente, se eligen regímenes de dosificación para limitar la toxicidad. Debe indicarse que el médico encargado sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia para disminuir la dosificación debido a toxicidad, o disfunciones de la médula ósea, hígado o riñón u otro tejido. A la inversa, el médico encargado también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles superiores si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo efectos secundarios tóxicos).

Se preparan composiciones farmacéuticamente aceptables en vista de su aprobación por una agencia reguladora u otra agencia preparadas según una farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y en humanos. Las composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Puede formularse una composición como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y otros agentes de este tipo. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra una PH20 soluble. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador así como para proporcionar la forma para su administración apropiada al paciente. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Pueden emplearse también soluciones salinas y dextrosa acuosa y disoluciones de glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Las composiciones pueden contener, junto con un principio activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato de dicalcio 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, melazas, polivinilpirrolidina, celulosas y derivados de las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes de este tipo 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 en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. Una composición, si se desea, puede contener también cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitano, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros agentes de este tipo.

Se proporcionan formulaciones de compuestos farmacéuticamente activos de manera terapéutica y derivados de los mismos para su administración a humanos y animales en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Por ejemplo pueden formularse compuestos como comprimidos, cápsulas, pastillas, polvos, gránulos,

disoluciones o suspensiones parenterales estériles, y disoluciones o suspensiones orales, y emulsiones de agua en aceite que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Los ejemplos de formas de dosis unitaria incluyen ampollas y jeringas y cápsulas o comprimidos envasados individualmente. Pueden administrarse formas de dosis unitaria en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitaria idénticas envasadas en un único recipiente que van a administrarse en formas de dosis unitaria segregadas. Los ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de pintas o galones. Por tanto, una forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no se segregan en el envasado. Generalmente, pueden prepararse composiciones o formas de dosificación que contienen el principio activo en el intervalo del 0,005% al 100% estando constituido el resto por portador no tóxico.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento se formulan normalmente para su administración mediante la vía subcutánea, aunque se contemplan otras vías de administración, tal como cualquier vía conocida por los expertos en la técnica incluyendo inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intralesional, administración epidural, vaginal, rectal, local, ótica, transdérmica o cualquier vía. Un experto en la técnica conoce formulaciones adecuadas para tales vías. La administración puede ser local, tópica o sistémica dependiendo del lugar de tratamiento. La administración local a una zona que necesita tratamiento puede lograrse mediante, por ejemplo, pero sin limitarse a, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, conjuntamente con un apósito para heridas tras la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante. Pueden administrarse también composiciones con otros agentes biológicamente activos, o bien secuencialmente, de manera intermitente o bien en la misma composición.

La vía más adecuada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores, tales como la naturaleza de la enfermedad, la tolerancia del sujeto a una vía de administración particular, la gravedad de la enfermedad y la composición particular que se usa. Normalmente, las composiciones proporcionadas en el presente documento se administran por vía parenteral. En algunos ejemplos, se administran composiciones de PH20 soluble de modo que alcanzan el intersticio de la piel o los tejidos, degradando de ese modo el espacio intersticial para la administración posterior de un agente terapéutico. Por tanto, en algunos ejemplos, se contempla la administración directa bajo la piel, tal como mediante métodos de administración subcutánea. Por tanto, en un ejemplo, puede lograrse la administración local mediante 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, puede lograrse la administración local mediante infusión, lo que puede facilitarse mediante el uso de una bomba u otro dispositivo similar. También se contemplan otros modos de administración. Pueden formularse composiciones farmacéuticas en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

Pueden emplearse métodos de administración para disminuir la exposición de polipéptidos de PH20 soluble seleccionados a procesos degradativos, tales como degradación proteolítica e intervención inmunológica por medio de respuestas antigénicas e inmunogénicas. Los ejemplos de tales métodos incluyen administración local en el sitio de tratamiento. Se ha notificado que la pegilación de productos terapéuticos aumenta la resistencia a la proteólisis, aumenta la semivida en plasma y disminuye la antigenicidad e inmunogenicidad. Se conocen en la técnica ejemplos de metodologías de pegilación (véase por ejemplo, Lu y Felix, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 43: 127-138, 1994; Lu y Felix, *Peptide Res.*, 6: 142-6, 1993; Felix *et al.*, *Int. J. Peptide Res.*, 46: 253-64, 1995; Benhar *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269: 13398-404, 1994; Brumeau *et al.*, *J. Immunol.*, 154: 3088-95, 1995; véase también, Caliceti *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). Puede usarse también la pegilación en la administración de moléculas de ácido nucleico *in vivo*. Por ejemplo, la pegilación de adenovirus puede aumentar la estabilidad y transferencia génica (véase, por ejemplo, Cheng *et al.* (2003) *Pharm. Res.* 20(9): 1444-51).

1. Productos inyectables, disoluciones y emulsiones

Se contempla en el presente documento la administración parenteral, caracterizada generalmente por inyección o infusión, o bien por vía subcutánea, por vía intramuscular, intravenosa o bien por vía intradérmica. Pueden prepararse productos inyectables en formas convencionales, o bien como suspensiones o bien como disoluciones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las composiciones farmacéuticas pueden contener otras cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad y otros agentes de este tipo, tales como por ejemplo, acetato de sodio, fosfato de sodio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. La implantación de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida, de manera que se mantenga un nivel de dosificación constante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 3.710.795) se contempla también en el presente documento. El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones parenterales es altamente dependiente de la naturaleza específica del mismo, así como de la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

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

Los portadores farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de Ringer con lactato y dextrosa. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Pueden añadirse agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales envasadas en recipientes de múltiples dosis, que incluyen fenoles o cresoles, compuestos de mercurio, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres metílicos y propílicos del ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilceluosa de sodio, 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 en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste del pH.

La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de modo que una inyección o infusión proporcione una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado, tal como control glucémico. La dosis exacta depende de la edad, el peso y el estado del paciente o animal tal como se conoce en la técnica. Las preparaciones parenterales de dosis unitaria pueden envasarse en, por ejemplo, una ampolla, un cartucho, un vial o una jeringa con una aguja. El volumen de la disolución líquida o la preparación de polvo reconstituida, que contiene el compuesto farmacéuticamente activo, es una función de la enfermedad que va a tratarse y el artículo particular de fabricación elegido para el envase. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, tal como se conoce y se pone en práctica en la técnica.

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

Polvos liofilizados

De interés en el presente documento son polvos liofilizados, que pueden reconstituirse para su administración como disoluciones, emulsiones y otras mezclas. Pueden reconstituirse y formularse también como sólidos o geles.

El polvo liofilizado, estéril se prepara disolviendo un compuesto de enzima inactiva en una disolución tampón. La disolución tampón puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o la disolución reconstituida, preparada a partir del polvo. La filtración estéril posterior de la disolución seguida por liofilización en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica proporciona la formulación deseada. En resumen, el polvo liofilizado se prepara disolviendo un excipiente, tal como dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, en un tampón adecuado, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón de este tipo conocido por los expertos en la técnica. Entonces, se añade una enzima seleccionada a la mezcla resultante, y se agita hasta que se disuelve. La mezcla resultante se filtra de manera estéril o se trata para eliminar materiales particulados y para garantizar la esterilidad, y se distribuye en viales para la liofilización. Cada vial contendrá una única dosificación o múltiples dosificaciones del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, tales como a aproximadamente 4°C a temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con una disolución tampón apropiada proporciona una formulación para su uso en administración parenteral.

2. Administración tópica

Se preparan mezclas tópicas tal como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una disolución, suspensión, emulsiones o similares y se formula como cremas, geles, pomadas, emulsiones, disoluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendajes, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para administración tópica.

Los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden formularse como aerosoles para aplicación tópica, tal como mediante inhalación (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.044.126, 4.414.209 y 4.364.923, que describen aerosoles para la administración de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Esas formulaciones para la administración al tracto respiratorio pueden estar en forma de un aerosol o una disolución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un portador inerte tal como lactosa. En un caso de este tipo, las partículas de la formulación tendrán normalmente diámetros de menos de 50 micrómetros, o menos de 10 micrómetros.

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

Se proporcionan formulaciones adecuadas para administración transdérmica. Pueden proporcionarse en cualquier formato adecuado, tal como parches diferenciados adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Tales parches contienen el compuesto activo en disolución acuosa opcionalmente tamponada de, por ejemplo, una concentración de 0,1 a 0,2 M con respecto al compuesto activo. Pueden administrarse también formulaciones adecuadas para administración transdérmica mediante iontoforesis (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Research 3(6):318 (1986)) y normalmente adoptan la forma de una disolución acuosa opcionalmente tamponada del compuesto activo.

3. Composiciones para otras vías de administración

Dependiendo del estado tratado, también se contemplan en el presente documento otras vías de administración, tales como aplicación tópica, parches transdérmicos, administración oral y rectal. Por ejemplo, formas de dosificación farmacéuticas para administración rectal son supositorios, cápsulas y comprimidos rectales para lograr un efecto sistémico. Los supositorios rectales incluyen cuerpos sólidos para su inserción en el recto que se funden o se ablandan a la temperatura corporal liberando uno o más principios farmacológica o terapéuticamente activos. Sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, carbowax (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Pueden usarse combinaciones de las diversas bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen esperma de ballena y cera. Pueden prepararse supositorios rectales o bien mediante el método de compresión o bien mediante moldeo. El peso típico de un supositorio rectal es de aproximadamente 2 a 3 g. Se fabrican comprimidos y cápsulas para administración rectal usando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y mediante los mismos métodos que para formulaciones para administración oral.

Pueden proporcionarse formulaciones adecuadas para administración rectal como supositorios de dosis unitaria. Estos pueden prepararse mezclando el compuesto activo con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y luego conformando la mezcla resultante.

Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

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

Pueden administrarse también composiciones farmacéuticas mediante formulaciones de liberación controlada y/o dispositivos de administración (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 3.536.809; 3.598.123; 3.630.200; 3.845.770; 3.847.770; 3.916.899; 4.008.719; 4.687.610; 4.769.027; 5.059.595; 5.073.543; 5.120.548; 5.354.566; 5.591.767; 5.639.476; 5.674.533 y 5.733.566).

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

Por tanto, en determinadas realizaciones, pueden emplearse también liposomas y/o nanopartículas con la administración de polipéptidos de PH20 soluble. Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapa concéntricas multilamerales (denominadas también vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV tienen generalmente diámetros de desde 25 nm hasta 4 µm. La sonicación de MLV da como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 ángstroms que contienen una disolución acuosa en el núcleo.

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

Los liposomas interaccionan con las células por medio de diferentes mecanismos: endocitosis por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial tales como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, mediante fuerzas o bien electrostáticas o bien hidrófobas débiles no específicas, o mediante interacciones específicas con componentes de la superficie celular; fusión con la membrana celular plasmática mediante inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea del contenido en el liposoma en el citoplasma; y mediante transferencia de lípidos liposomales a membranas celulares o subcelulares, o viceversa, sin ninguna asociación de los contenidos en liposoma. La variación de la formulación del liposoma puede alterar qué mecanismo está operativo, aunque más de uno puede funcionar al mismo tiempo. Las nanocápsulas generalmente pueden atrapar compuestos de un modo estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de tamaños de alrededor de 0,1 µm) deben diseñarse usando polímeros que pueden degradarse *in vivo*. Se contemplan nanopartículas de poli(cianoacrilato de alquilo) biodegradables que cumplen estos requisitos para su uso en el presente documento, y tales partículas pueden prepararse fácilmente.

4. Dosificación y administración

Los polipéptidos de PH20 soluble, incluyendo esPH20, proporcionados en el presente documento pueden formularse como composiciones farmacéuticas para la administración de dosificación única o de dosificación múltiple. La enzima que degrada hialuronano seleccionada se incluye en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios no deseados en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente sometiendo a prueba los polipéptidos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos tal como usando los ensayos proporcionados en el presente documento o conocidos en la técnica (véanse por ejemplo, Taliani *et al.* (1996) *Anal. Biochem.*, 240: 60-67; Filocamo *et al.* (1997) *J Virology*, 71: 1417-1427; Sudo *et al.* (1996) *Antiviral Res.* 32: 9-18; Buffard *et al.* (1995) *Virology*, 209:52-59; Bianchi *et al.* (1996) *Anal. Biochem.*, 237: 239-244; Hamatake *et al.* (1996) *Intervirology* 39:249-258; Steinkuhler *et al.* (1998) *Biochem.*, 37:8899-8905; D'Souza *et al.* (1995) *J Gen. Virol.*, 76:1729-1736; Takeshita *et al.* (1997) *Anal. Biochem.*, 247:242-246; véanse también por ejemplo, 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. Met.* 65:201-207 y luego extrapolarse a partir de los mismos para dosificaciones para seres humanos.

Normalmente, una dosis terapéuticamente eficaz de una enzima PH20 soluble es de o aproximadamente 10 unidades (U) a 500.000 unidades, de 100 unidades a 100.000 unidades, de 500 unidades a 50.000 unidades, de 1000 unidades a 10.000 unidades, de 5000 unidades a 7500 unidades, de 5000 unidades a 50.000 unidades, o de 1.000 unidades a 10.000 unidades, generalmente de 1.000 a 50.000 unidades, en una disolución o suspensión estabilizada o una forma liofilizada. Las formulaciones pueden proporcionarse en formas de dosis unitaria tales como, pero sin limitarse a, ampollas, jeringas y cápsulas o comprimidos envasados individualmente. El agente de dispersión puede administrarse solo, o con otro agente farmacológicamente eficaz en un volumen total de 0,1-100 ml, 1-50 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml o 1-10 ml, normalmente 10-50 ml.

Por ejemplo, una PH20 soluble, incluyendo esPH20, puede administrarse por vía subcutánea a o aproximadamente

10 U, 20 U, 30 U, 40 U, 50 U, 100 U, 150 U, 200 U, 250 U, 300 U, 350 U, 400 U, 450 U, 500 U, 600 U, 700 U, 800 U, 900 U, 1000 U, 2.000 U, 3.000 U, 4.000 unidades, 5.000 U o más. En algunos ejemplos, pueden proporcionarse dosificaciones como una razón de cantidad de una PH20 soluble con respecto a agente terapéutico administrado. Por ejemplo, un polipéptido de PH20 soluble puede administrarse a de 1 U de hialuronidasa/U de agente terapéutico (1:1) a 50:1 o más, por ejemplo, a o aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 o más. Normalmente, los volúmenes de inyecciones o infusiones de una PH20 soluble contemplados en el presente documento son de desde o aproximadamente 0,01 ml, 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml o más. La PH20 soluble puede proporcionarse como una disolución madre a o aproximadamente 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 800 U/ml o 1000 U/ml, o puede proporcionarse en una forma más concentrada, por ejemplo a o aproximadamente 2000 U/ml, 3000 unidades/ml, 4000 U/ml, 5000 U/ml, 8000 U/ml, 10.000 U/ml o 20.000 U/ml para su uso directamente o para dilución hasta la concentración eficaz antes de su uso. La PH20 soluble puede proporcionarse como una formulación líquida o liofilizada.

15 5. Envasado, artículos de fabricación y kits

Los compuestos farmacéuticos de polipéptidos de PH20 soluble, incluyendo esPH20, o ácidos nucleicos que codifican para tales polipéptidos, o un derivado o una variante de los mismos pueden envasarse como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno, y una etiqueta que indica que la PH20 soluble o molécula de ácido nucleico va a usarse para tratar la enfermedad o el trastorno. Pueden envasarse también combinaciones de una hialuronidasa PH20 soluble seleccionada, o derivado o variante de la misma y un agente terapéutico en un artículo de fabricación.

Los artículos de fabricación proporcionados en el presente documento contienen materiales de envasado. Los materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos los conocen bien los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.252. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, envases de blíster, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, frascos y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo de administración y tratamiento previsto. Los artículos de fabricación pueden incluir una aguja u otro dispositivo de inyección para facilitar la administración (por ejemplo administración subepidérmica) para fines de inyección local. Se contempla una amplia gama de formulaciones de los compuestos y las composiciones proporcionados en el presente documento que incluyen na PH20 soluble, tal como una esPH20, y un agente terapéutico conocido para tratar una enfermedad o un trastorno particular. La elección del envase depende de la PH20 soluble y/o el agente terapéutico, y si tales composiciones se envasarán juntas o por separado. En un ejemplo, la PH20 soluble puede envasarse como una mezcla con el agente terapéutico. En otro ejemplo, los componentes pueden envasarse como composiciones separadas.

Los polipéptidos de PH20 soluble seleccionados, tales como polipéptidos de esPH20, agentes terapéuticos y/o artículos de fabricación de los mismos pueden proporcionarse también como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y un elemento para su administración proporcionados como un artículo de fabricación. Por ejemplo un polipéptido de PH20 soluble puede suministrarse con un dispositivo para su administración, tal como una jeringa, un inhalador, un recipiente de dosificación, un cuentagotas o un aplicador. Las composiciones pueden estar contenidas en el elemento para su administración o pueden proporcionarse por separado para añadirse posteriormente. El kit, opcionalmente, puede incluir instrucciones para la aplicación incluyendo dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para los modos de administración. Los kits pueden incluir también una composición farmacéutica descrita en el presente documento y un elemento para el diagnóstico. Por ejemplo, tales kits pueden incluir un elemento para medir la concentración, la cantidad o la actividad de de la proteasa seleccionada en un sujetao.

50 G. Ensayos

Los polipéptidos de PH20 soluble proporcionados en el presente documento, incluyendo polipéptidos de esPH20, son solubles y conservan una actividad enzimática hialuronidasa. Los polipéptidos de PH20 N-glicosilados o parcialmente N-glicosilados proporcionados en el presente documento conservan una actividad enzimática hialuronidasa. La actividad de una PH20 proporcionada en el presente documento es o es de aproximadamente el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más en comparación con la actividad de una PH20 correspondiente que no está truncada en el extremo C-terminal o parcialmente N-glicosilada. La actividad de un polipéptido de hialuronidasa PH20 soluble, tal como una esPH20, puede evaluarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, un ensayo de microturbidez y un ensayo de microtitulación usando ácido hialurónico biotinilado. La actividad y las evaluaciones pueden realizarse en medio condicionado o sobrenadantes o sobre proteína purificada. La solubilidad de una proteína puede determinarse también, por ejemplo, mediante un ensayo de reparto en Triton® X-114. En todos los ensayos, la actividad o solubilidad de una PH20 soluble puede compararse con un control, por ejemplo, una PH20 de longitud completa que carece de truncamientos C-terminales.

65 1. Actividad hialuronidasa

La actividad de un polipéptido de PH20 soluble puede evaluarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ensayo de la USP XXII para hialuronidasa determina la actividad indirectamente midiendo la cantidad de sustrato de ácido hialurónico no degradado, o hialuronano, (HA) que queda tras dejar que la enzima reaccione con el HA durante 30 min a 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Puede usarse un patrón de referencia de hialuronidasa (USP) o disolución patrón de hialuronidasa del National Formulary (NF) en un ensayo para determinar la actividad, en unidades, de cualquier hialuronidasa.

En un ejemplo, la actividad se mide usando un ensayo de microturbidez, tal como se describe en el ejemplo 12. Esto se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con albúmina sérica. La actividad se mide incubando hialuronidasa con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo fijo (por ejemplo 10 minutos) y luego precipitando el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina sérica acidificada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm tras un periodo de desarrollo adicional. La disminución en la turbidez resultante de la actividad hialuronidasa sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática hialuronidasa.

En otro ejemplo, la actividad hialuronidasa se mide usando un ensayo de microtitulación en el que se mide ácido hialurónico biotinilado residual tras la incubación con hialuronidasa (véase por ejemplo Frost y Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, publicación de patente estadounidense n.º 20050260186). En el ejemplo 4, la actividad hialuronidasa de hialuronidasa PH20 humana truncada se determina usando ácido hialurónico biotinilado. 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. Tras la incubación con hialuronidasa, se detecta el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual usando una reacción de avidina-peroxidasa, y se compara con el obtenido tras la reacción con patrones de hialuronidasa de actividad conocida. Puesto que el sustrato está unido covalentemente a la placa de microtitulación, no se producen artefactos tales como desplazamiento dependiente del pH del sustrato biotinilado. La sensibilidad permite una medición rápida de la actividad hialuronidasa a partir de células cultivadas y muestras biológicas con una variación entre ensayos de menos del 10%.

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

Muchos ensayos de hialuronidasa se han basado en la medición de la generación de nuevos grupos N-acetilamino reductores (Bonner y Cantey, Clin. Chim. Acta 13:746-752, 1966), o la pérdida de viscosidad (De Salegui *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 121:548-554, 1967) o turbidez (Dorfman y Ott, J. Biol. Chem. 172:367, 1948). Con sustratos purificados todos estos métodos son suficientes para la determinación de la presencia o ausencia de actividad endoglucosamídica.

Pueden usarse también sustratos de glicosaminoglicano sustancialmente purificados en un ensayo de desplazamiento en gel. Se mezclan glicosaminoglicanos con PH20 recombinante, tal como una PH20 soluble, para someter a prueba la actividad endoglucosidasa que da como resultado un desplazamiento en la movilidad del sustrato dentro del gel. Tales sustratos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, 4- y 6-sulfato de condroitina, condroitina, sulfato de heparano, que pueden obtenerse de Sigma Chemical. Puede obtenerse hialuronano de cordón umbilical humano de ICN. Por ejemplo, cada sustrato de prueba puede diluirse hasta a o aproximadamente 0,1 mg/ml en un tampón que oscila entre pH 3,5-7,5. En un ensayo a modo de ejemplo de este tipo, pueden mezclarse muestras de aproximadamente 10 µl de PH20 soluble purificada o medios condicionados de células que expresan PH20 con a o aproximadamente 90 µl de sustrato de prueba en tampón deseado e incubarse durante 3 horas a 37°C. Tras la incubación, se neutralizan las muestras con tampón de muestra (Tris EDTA a pH 8,0, azul de bromofenol y glicerol) seguido por electroforesis. Pueden detectarse glicosaminoglicanos usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, pueden detectarse glicosaminoglicanos tiñendo los geles usando azul alcian al 0,5% en ácido acético glacial al 3% durante la noche seguido por eliminación de la tinción en ácido acético glacial al 7%. La degradación se determina mediante comparación de la movilidad de sustratos en presencia y ausencia de enzima.

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

La capacidad de un polipéptido de PH20 soluble para actuar como agente de extensión o difusión puede evaluarse también. Por ejemplo, puede inyectarse por vía subcutánea colorante azul trípano con o sin una PH20 soluble en la piel lateral en cada costado de ratones desnudos. Se mide entonces el área con colorante, tal como con un microcalibre, para determinar la capacidad de la enzima que degrada hialuronano para actuar como agente de extensión (patente estadounidense n.º 20060104968). El efecto de la administración conjunta de hialuronidasa con

otro agente, por ejemplo un agente terapéutico, sobre las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de ese agente puede evaluarse también *in vivo* usando un modelo animal y/o sujetos humanos, tal como en el entorno de un ensayo clínico.

- 5 La actividad funcional de una PH20 soluble, tal como es PH20 puede compararse y/o normalizarse con un patrón de referencia usando cualquiera de estos ensayos. Esto puede realizarse para determinar la cantidad funcionalmente equivalente de una PH20 soluble. Por ejemplo, la capacidad de una PH20 soluble para actuar como un agente de extensión o difusión puede evaluarse inyectando en la piel lateral de ratones con azul tripano, y puede determinarse la cantidad requerida para lograr la misma cantidad de difusión que, por ejemplo, 100 unidades de patrón de referencia de hialuronidasa. La cantidad de PH20 soluble requerida es, por tanto, funcionalmente equivalente a 100 unidades de hialuronidasa.

2. Solubilidad

- 15 La solubilidad de una hialuronidasa puede determinarse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. Un método para determinar la solubilidad es mediante reparto en detergente. Por ejemplo, puede distinguirse un polipéptido de PH20 soluble, por ejemplo, por su reparto en la fase acuosa de una disolución de Triton® X-114 a 37°C (Bordier *et al.*, (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-1607). Por ejemplo, la solubilidad de los polipéptidos de PH20 descritos en el presente documento se evalúa tal como se describe en el ejemplo 4. Hialuronidasas ancladas a la membrana, tales como hialuronidasas ancladas a lípidos, incluyendo hialuronidasas con anclaje de GPI, se repartirán en la fase rica en detergente, pero se repartirán en la fase acuosa o pobre en detergente tras el tratamiento con fosfolipasa C. La fosfolipasa C es una enzima que escinde el enlace fosfo-glicerol que se encuentra en proteínas con anclaje de GPI. El tratamiento con PLC provocará la liberación de proteínas con anclaje de GPI de la membrana celular externa.

- 25 Otro método para evaluar la solubilidad es determinar si un polipéptido de PH20 tiene anclaje de GPI. Un polipéptido de PH20 con anclaje de GPI está unido a la membrana celular y por tanto es insoluble. Para determinar si un polipéptido de PH20 tiene anclaje de GPI, puede evaluarse la solubilidad antes y después de la hidrólisis con PLC/PLD, y también el uso de algoritmos de predicción para identificar una secuencia señal de unión a anclaje de GPI. Pueden identificarse proteínas con anclaje de GPI por su solubilización tras la escisión enzimática o química específica, conjuntamente con reparto en detergente (por ejemplo, en Triton® X-114), reconocimiento de anticuerpos y marcaje radiactivo metabólico.

- 35 Un método común usado para demostrar que una proteína tiene un anclaje de GPI es su liberación de la superficie celular o su solubilización mediante tratamiento con PI-PLC bacteriana o fosfolipasa C específica de GPI (GPI-PLC) derivada de tripanosomas. Estas enzimas escinden un diacilglicerol en la membrana y producen el epítipo de glicano inmunorreactivo (CRD) en la proteína, que puede detectarse mediante inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos producidos contra el GPI de tripanosomas. Un problema común con este enfoque que se encuentra especialmente en células de mamífero es que las lipasas no pueden escindir un anclaje de GPI en el que el inositol está acilado. Esto requiere un tratamiento previo con álcali suave para eliminar el ácido graso en el anillo de inositol. Alternativamente, puede usarse fosfolipasa D específica de GPI derivada de suero para escindir los anclajes de GPI. Esta enzima escinde entre el anillo de inositol y el resto ácido fosfatídico y no se inhibe por la acilación del inositol. El ácido fluorhídrico escinde los anclajes de GPI entre el anillo de inositol y el ácido fosfatídico y también escinde las uniones fosfodiéster entre cualquier residuo de fosfoetanolamina y manosilo. El ácido nítrico diluido es particularmente útil en el estudio de anclajes de GPI porque escinde específicamente entre la glucosamina no acilada y el anillo de inositol, liberando el glicano unido a proteína (que contiene ahora un resto anhidromanosa de diagnóstico) y fosfatidilinositol. En combinación con anticuerpos frente a CRD, análisis de composición, marcaje radiactivo con mio-inositol, etanolamina, glucosamina, manosa o ácidos grasos y métodos de reparto en detergente o cromatográficos, estos métodos de degradación representan un poderoso conjunto de herramientas para estudiar los anclajes de GPI en proteínas.

- Se han desarrollado diversos métodos *in silico* y algoritmos que pueden usarse para identificar secuencias consenso de señal de unión a anclaje de GPI en polipéptidos (véanse, por ejemplo Udenfriend *et al.* (1995) Methods Enzymol. 250:571-582; Eisenhaber *et al.*, (1999) J. Biol. Chem. 274:741-758, Kronegg y Buloz, (1999); "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)", 129,194,185,165/dgpi; Fankhauser *et al.*, (2005) Bioinformatics 21:1846-1852; Omaetxebarria *et al.*, (2007) Proteomics 7:1951-1960; Pierleoni *et al.*, (2008) BMC Bioinformatics 9:392); incluyendo los que están fácilmente disponibles en sitios web de bioinformática, tales como el sitio de herramientas ExPASy Proteomics (expasy.ch/tools/). Por tanto, un experto en la técnica puede determinar si un polipéptido de PH20 contiene una secuencia señal de unión a anclaje de GPI y, por tanto, si el polipéptido de PH20 es una proteína con anclaje de GPI.

H. Métodos de tratamiento y usos de PH20 soluble extendida y otra PH20 soluble y terapia de combinación

- Se han preparado diversas formas de hialuronidasas PH20 y se han aprobado para uso terapéutico en seres humanos. Por ejemplo, las preparaciones de hialuronidasa derivada de animales incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada, y Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), una

hialuronidasa testicular bovina. Hilenex® (Halozyme Therapeutics) es una hialuronidasa recombinante humana producida modificando por ingeniería genética células de ovario de hámster chino (CHO) que contienen ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble. Los usos terapéuticos aprobados para hialuronidasa incluyen el uso como adyuvante para aumentar la absorción y dispersión de otros agentes terapéuticos, para hipodermoclisis (administración subcutánea de fluido), y como adyuvante en urografía subcutánea para mejorar la resorción de agentes radiopacos. Además de estas indicaciones, pueden usarse hialuronidasas como agente terapéutico o cosmético para el tratamiento de enfermedades y estados adicionales.

También se han usado hialuronidasas para potenciar la actividad de agentes quimioterápicos y/o la accesibilidad de tumores a agentes quimioterápicos (Schuller *et al.*, 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32:173, resumen n.º 1034; Czejka *et al.*, 1990, Pharmazie 45:H.9). La quimioterapia de combinación con hialuronidasa es eficaz en el tratamiento de una variedad de cánceres incluyendo cáncer de vejiga urinaria (Horn *et al.*, 1985, J. Surg. Oncol. 28:304-307), carcinoma de células escamosas (Kohno *et al.*, 94, J. Cancer Res. Oncol. 120:293-297), cáncer de mama (Beckenlehner *et al.*, 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118:591-596) y cáncer gastrointestinal (Scheithauer *et al.*, 1988, Anticancer Res. 8:391-396). La hialuronidasa es eficaz como agente terapéutico único en el tratamiento de cáncer cerebral (gliomas) (publicación PCT publicada n.º WO88/02261, publicada el 7 de abril de 1988). La administración de hialuronidasa también induce receptividad de tumores anteriormente resistentes a la quimioterapia del páncreas, del estómago, del colon, de los ovarios y de mama (Baumgartner *et al.*, 1988, Reg. Cancer Treat. 1:55-58; Zanker *et al.*, 1986, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27:390). Desafortunadamente, los contaminantes y la naturaleza no humana de tales hialuronidasas da como resultado reacciones anafilácticas.

Además de sus efectos anticancerígenos, las hialuronidasas también tienen efectos anticarcinogénicos directos. La hialuronidasa impide el crecimiento de tumores trasplantados a ratones (De Maeyer *et al.*, 1992, Int. J. Cancer 51:657-660) e inhibe la formación de tumores tras la exposición a carcinógenos (Pawlowski *et al.*, 1979, Int. J. Cancer 23:105-109; Haberman *et al.*, 1981, Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Washington, D.C., 22:105, resumen n.º 415).

En particular, la hialuronidasa PH20 puede usarse para tratar enfermedades o estados asociados a hialuronano con alta presión de fluido intersticial, tal como presión de disco, trastornos proliferativos, tales como cáncer e hiperplasia prostática benigna, y edema. El edema puede resultar de o manifestarse en, por ejemplo, a partir de trasplante de órganos, accidente cerebrovascular o traumatismo craneoencefálico. Los trastornos proliferativos incluyen, pero no se limitan a, cáncer, proliferación de células de músculo liso, esclerosis sistémica, cirrosis del hígado, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, cardiomiopatía idiopática, lupus eritematoso, retinopatía, por ejemplo, retinopatía diabética u otras retinopatías, hiperplasia cardíaca, trastornos asociados al sistema reproductor, tales como hiperplasia prostática benigna (BPH) y quistes de ovarios, fibrosis pulmonar, endometriosis, fibromatosis, hamatomas, linfangiomatosis, sarcoidosis, tumores desmoides. Los cánceres incluyen tumores sólidos y linfáticos/sanguíneos y enfermedad metastásica, y tumores no diferenciados. Los tumores propensos al tratamiento presentan normalmente expresión celular y/o estromal de un hialuronano, en comparación con un tejido no canceroso del mismo tipo de tejido o en comparación con un tumor no metastásico del mismo tipo de tumor. Los cánceres incluyen uno cualquiera o más de cáncer de ovario, carcinoma *in situ* (ISC), carcinoma de células escamosas (SCC), cáncer de próstata, cáncer pancreático, otros cánceres gástricos, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer cerebral y cáncer de colon.

Por tanto, las hialuronidasas PH20 tienen múltiples usos, incluyendo y además su uso como agente de extensión. La hialuronidasa se usa comúnmente, por ejemplo, para bloqueo peribulbar en anestesia local antes de cirugía oftálmica. La presencia de la enzima impide la necesidad de bloqueos adicionales y acelera el tiempo hasta el comienzo de la acinesia (pérdida de movimiento ocular). El bloqueo peribulbar y subtenoniano son las aplicaciones más comunes de la hialuronidasa para procedimientos oftálmicos. La hialuronidasa puede promover también acinesia en cirugía cosmética, tal como blefaroplastias y renovaciones faciales. Se entiende que las hialuronidasas PH20 solubles proporcionadas en el presente documento, incluyendo hialuronidasas esPH20, pueden usarse en cualquier método de tratamiento o terapia de combinación para el que se usa una hialuronidasa PH20 (véanse, por ejemplo, las publicaciones estadounidenses n.ºs US20040268425; US20050260186; US20060104968; y las solicitudes estadounidenses con n.º de serie 12/381.844, 12/386.249, 12/387.225 y 12/386.222). A continuación se describen usos cosméticos y terapéuticos a modo de ejemplo para hialuronidasa.

1. Uso como agente de extensión y terapia de combinación

Tal como se indicó anteriormente, la hialuronidasa es una sustancia de extensión o difusión que modifica la permeabilidad del tejido conjuntivo a través de la hidrólisis de ácido hialurónico, un polisacárido que se encuentra en la sustancia fundamental intercelular del tejido conjuntivo, y de determinados tejidos especializados, tales como el cordón umbilical y el humor vítreo. Cuando no está presente ningún factor de extensión, los materiales inyectados por vía subcutánea, tales como fármacos, proteínas, péptidos y ácido nucleico, se extienden muy lentamente. Sin embargo, la inyección conjunta con hialuronidasa puede provocar una extensión rápida. La velocidad de difusión es proporcional a la cantidad de enzima, y el grado de difusión es proporcional al volumen de la disolución.

Puede usarse PH20, incluyendo PH20 soluble tal como esPH20 proporcionada en el presente documento, para

promover o potenciar el suministro de agentes y moléculas a cualquiera de una variedad de tejidos de mamífero *in vivo*. Puede usarse para facilitar la difusión y, por tanto, promover el suministro, de agentes farmacológicos de molécula pequeña así como agentes farmacológicos de molécula más grande, tales como proteínas, ácidos nucleicos y ácidos ribonucleicos, y composiciones macromoleculares que pueden contener una combinación de componentes incluyendo, pero sin limitarse a, ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, moléculas de base lipídica y fármacos (véanse por ejemplo las publicaciones estadounidenses n.ºs US20040268425; US20050260186; y US20060104968). Puede administrarse PH20, incluyendo PH20 soluble tal como esPH20, conjuntamente y/o formularse conjuntamente con un agente terapéutico para mejorar la biodisponibilidad así como las características farmacocinéticas (PK) y/o farmacodinámicas (PD) de agentes formulados conjuntamente o administrados conjuntamente. Los parámetros de PK/PD que pueden mejorarse usando PH20 soluble, tal como esPH20, incluyen medidas tales como $C_{m\acute{a}x}$ (la concentración máxima de agente lograda tras la absorción en, por ejemplo, el torrente sanguíneo), $T_{m\acute{a}x}$ (el tiempo requerido hasta lograr la concentración máxima), $T_{1/2}$ (el tiempo requerido para que la concentración descienda a la mitad), $C_{m\acute{i}n}$ (la concentración mínima de agente tras el metabolismo y la excreción), AUC (área bajo la curva de concentración frente a tiempo, una medida de la cantidad global de biodisponibilidad), concentraciones en diversos tejidos de interés (incluyendo, por ejemplo, la velocidad para lograr las concentraciones deseadas, los niveles globales y la duración del mantenimiento de los niveles deseados) y $E_{m\acute{a}x}$ (el efecto máximo logrado).

Los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento incluyen terapias de combinación con un agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno para el que el agente terapéutico supone una amenaza. Cualquier agente terapéutico que mejore y/o disminuya de otro modo la gravedad de una enfermedad o un estado puede combinarse con una PH20 soluble proporcionada en el presente documento con el fin de aumentar la biodisponibilidad de tal agente terapéutico. En particular, pueden usarse polipéptidos de PH20 soluble proporcionados en el presente documento, tales como esPH20, en todas y cada una de las combinaciones descritas en solicitudes, véanse por ejemplo las publicaciones estadounidenses n.ºs US20040268425; US20050260186; US20060104968 y las solicitudes estadounidenses con n.º de serie 12/381.844, 12/386.249, 12/387.225 y 12/386.222 en lugar la hialuronidasa o enzima que degrada hialuronidasa divulgada.

Pueden administrarse polipéptidos de PH20 soluble proporcionados en el presente documento, en particular polipéptidos de esPH20, antes, posteriormente, de manera intermitente o simultáneamente con la preparación de agente terapéutico. Generalmente, la PH20 soluble se administra antes de o simultáneamente con la administración de la preparación de agente terapéutico para permitir que la PH20 soluble degrade el ácido hialurónico en el espacio intersticial. La PH20 soluble puede administrarse en un sitio diferente al sitio de administración de la molécula terapéutica o la PH20 soluble puede administrarse en un sitio igual que el sitio de administración de la molécula terapéutica.

Los ejemplos de agentes farmacéuticos, terapéuticos y cosméticos y moléculas que pueden administrarse con hialuronidasa incluyen, pero no se limitan a, un agente quimioterápico o anticancerígeno, un agente analgésico, un agente antibiótico, un agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente amebicida, un agente tricomonocida, un agente antiparkinsoniano, un agente antipalúdico, un agente anticonvulsivo, un agente antidepresivo, un agente antiartrítico, un agente antifúngico, un agente antihipertensivo, un agente antipirético, un agente antiparasitario, un agente antihistamínico, un agente agonista alfa-adrenérgico, un agente alfbloqueante, un agente anestésico, un agente broncodilatador, un agente biocida, un agente bactericida, un agente bacteriostático, un agente bloqueante beta-adrenérgico, un agente bloqueante de canales de calcio, un agente farmacológico cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente cosmético o estético, un agente descongestivo, un agente diurético, un agente depresor, un agente de diagnóstico, un agente de electrolito, un agente hipnótico, un agente hormonal, un agente hiperglucémico, un agente relajante muscular, un agente contractor muscular, un agente oftálmico, un agente parasimpatomimético, un agente energizante psíquico, un agente sedante, un inductor del sueño, un agente simpatomimético, un agente tranquilizante, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente de vitamina, un agente antiinflamatorio no esteroideo o un agente inhibidor de enzima convertidora de angiotensina, y cualquier combinación de los mismos. En particular, los agentes terapéuticos incluyen anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, bisfosfonatos, insulinas e inmunoglobulinas.

Por ejemplo, los agentes antibióticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aminoglicósidos; amfenicoles; ansamicinas; carbacefems; carbapenems; cefalosporinas o cefems; cefamicinas; clavamas; lipopéptidos cíclicos; diaminopirimidinas; cetólidos; lincosamidas; macrólidos; monobactamas; nitrofuranos; oxacefems; oxazolidinonas; penems; tienamicinas y beta-lactamas misceláneas; penicilinas; antibióticos polipeptídicos; quinolonas; sulfonamidas; sulfonas; tetraciclinas; y otros antibióticos (tales como clofocoles, ácidos fusídicos, hexedinas, metenaminas, nitrofurantoínas, nitroxolinas, ritipenems, taurolidinas, xibomoles).

También se incluyen entre los agentes terapéuticos a modo de ejemplo modificadores sanguíneos tales como factores antihemofílicos, complejos coagulantes anti-inhibidor, antitrombinas III, factores de coagulación Vh, factores de coagulación VIII, factores de coagulación IX, fracciones de proteínas plasmáticas, factores de von Willebrand; agentes antiplaquetarios (incluyendo, por ejemplo, abciximabs, anagrelidas, cilostazoles, bisulfatos de clopidogrel, dipiridamoles, epoprostenoles, eptifibatidas, tirofibanos; factores estimulantes de colonias (CSF) (incluyendo, por ejemplo, CSF de granulocitos y CSF de granulocitos y macrófagos); estimuladores de la eritropoyesis (incluyendo,

por ejemplo, eritropoyetinas tales como darbepoetinas alfa) y epoetinas alfa; hemostásicos y albúminas (incluyendo, por ejemplo, aprotininas, combinaciones de factores antihemofílicos y plasma, acetatos de desmopresina y albúminas); globulinas inmunitarias, así como globulinas inmunitarias de hepatitis B; inhibidores de trombina (incluyendo por ejemplo inhibidores directos de trombina y lepirudina), y drotecoginas alfa; anticoagulantes (incluyendo, por ejemplo, dalteparinas, enoxaperinas y otras heparinas, y warfarinas).

Otros agentes terapéuticos a modo de ejemplo que pueden combinarse mediante administración conjunta y/o formulación conjunta con una PH20 soluble, tal como una esPH20, incluyen, pero no se limitan a, adalimumabs, agalsidasas beta, alefacepts, ampicilinas, anakinras, vacunas antipoliomielíticas, anti-timocitos, azitromicinas, becaplerminsa, caspofunginas, cefazolinás, cefepimes, cefotetanos, ceftazidimas, ceftriaxonas, cetuximabs, cilastatinas, ácidos clavulánicos, clindamicinas, darbepoetinas alfa, deacizumabs, difteria, antitoxinas diféricas, toxoides diféricas, efalizumabs, epinefrinas, eritropoyetinas alfa, etanercept, filgrastims, fluconazoles, hormonas foliculoestimulantes, folitropinas alfa, folitropinas beta, fosfeniloínas, gadodiamidas, gadopentetatos, gatifloxacinos, glatirámicos, GM-CSF, goserelinas, acetatos de goserelina, granisetrones, *Haemophilus influenza* B, haloperidolos, vacunas contra la hepatitis, vacunas contra hepatitis A, vacunas contra hepatitis B, ibritumomab tiuxetanos, ibritumomabs, tiuxetanos, inmunoglobulinas, vacunas contra *Hemophilus influenza*, vacunas contra el virus influenza, infliximabs, insulinas, insulinas glargina, interferones, interferones alfa, interferones beta, interferones gamma, interferones alfa-2a, interferones alfa-2b, interferones alfa-1, interferones alfa-n3, interferones beta, interferones beta-1a, interferones gamma, interferón alfa-consenso, iodixanoles, iohexoles, iopamidoles, ioversoles, ketorolacos, laronidasas, levofloxacinos, lidocainas, linezolidas, lorazepamias, vacunas del sarampión, virus del sarampión, virus de las paperas, vacunas contra los virus del sarampión-paperas-rubéola, vacunas contra la rubéola, medroxiprogesteronas, meropenems, metilprednisolonas, midazolamas, morfina, octreotidas, omalizumabs, ondansetrones, palivizumabs, pantoprazoles, pegasparginas, pegfilgrastims, peg-interferón alfa-2a, peg-interferón alfa-2b, pegvisomants, vacunas pertussis, piperacilinas, vacunas pneumocócicas y vacunas de conjugados pneumocócicos, prometazinas, reteplásas, somatropinas, sulbactamas, sumatriptanos, tazobactamas, tenecteplásas, toxoides tetánicos purificados, ticarcilinas, tositumomabs, triamcinolonas, acetónicos de triamcinolona, hexacetónidos de triamcinolona, vancomicinas, inmunoglobulinas contra varicela zóster, vacunas contra la varicela, otras vacunas, alemtuzumabs, alitretinoínas, alopurinoles, altretaminas, amifostinas, anastrozoles, arsénicos, trióxidos de arsénico, asparaginasas, vacunas contra bacilo Calmette-Guerin (BCG), BCG vivo, bexaroteno, bleomicinas, busulfanos, busulfano intravenoso, busulfanos orales, calusteronas, capecitabinas, carboplatinos, carmustinas, carmustinas con polifeprosanos, celecoxibs, clorambucilos, cisplatinos, cladribinas, ciclofosfamidás, citarabinas, citarabinas liposomales, dacarbazinas, dactinomicinas, daunorubicinas liposomales, daunorubicinas, daunomicinas, denileucinas difitox, dexrazoxanos, docetaxelas, doxorubicinas, doxorubicinas liposomales, propionatos de dromostanolona, disoluciones B de Elliot, epirubicinas, epoetinas alfa, estramustinas, etopósidos, fosfatos de etopósido, etopósidos VP-16, exemestanos, floxuridinas, fludarabinas, fluorouracilos, 5-fluorouracilos, fulvestrants, gemcitabinas, gemtuzumabs, ozogamicinas, gemtuzumab ozogamicinas, hidroxiureas, idarubicinas, ifosfamidas, mesilatos de imatinib, irinotecanos, letrozoles, leucovorinas, levamisoles, lomustinas, CCNU, mecloretaminas, mostazas de nitrógeno, megestroles, acetatos de megestrol, melfalano, L-PAM, mercaptopurinas, 6-mercaptopurinas, mesnas, metotrexatos, metoxsalenos, mitomicinas, mitomicinas C, mitotanos, mitoxantronas, nandrolonas, fenpropionatos de nandrolona, nofetumomabs, oprelvequinas, oxaliplatinos, paclitaxelas, pamidronatos, pegademiasas, pentostatinas, pipobromanos, plicamicinas, mitramicinas, porfímeros, porfímeros sódicos, procarbazonas, quinacrinas, rasburicasas, rituximabs, sargramostims, estreptozocinas, talcos, tamoxifeno, temozolomidas, tenipósidos, testolactonas, tioguaninas, 6-tioguaninas, trietilentiofosforamidás (tiotepas), topotecanos, toremifeno, trastuzumabs, tretinoínas, mostazas de uracilo, valrubicinas, vinblastinas, vincristinas, vinorelbinas, zoledronatos, acivicinas, aclarubicinas, acodazoles, acroninas, adozelesinas, aldesleucinas, ácidos retinoicos, alitretinoínas, ácidos 9-cis-retinoicos, alvocidibs, ambazonas, ambomicinas, ametantronas, aminoglutetimidas, amsacrinas, anaxironas, ancitabinas, antramycinas, apaziquonas, argimesnas, asperlinas, atrimustinas, azacitidinas, azetepas, azotomicinas, banoxantronas, batabulinas, batimastats, benaxibinas, bizelesinas, bortezomibs, brequinars, bropiriminas, budotitanos, cactinomicinas, canertinibs, caracemidas, carbetímeros, carboquonas, carmofurs, carubicinas, carzelesinas, cedefingoles, cemadotinas, clorambucilos, cioteronels, cirolemicinas, clafenurs, clofarabinas, crisnatoles, decitabinas, dexniguldipinas, dexormaplatinos, dezaguaninas, diaziquonas, dibrospidios, dienogests, dinalinas, disermolidas, dofequidars, doxifluridinas, droloxifeno, duazomicinas, ecomustinas, edatrexatos, edotecarinas, eflomitinas, elacridars, elinafidas, elsamitrucinas, emitefurs, enloplatinos, enpromatos, enzastaurinas, epiropidinas, eptaloprosts, erbulozoles, esorubicinas, etanidazoles, etoglúcidos, etoprinas, exisulindas, fadrozoles, fazarabinas, fenretinidas, fluroximesteronas, flurocitabinas, fosquidonas, fostriecinas, fotretaminas, galarubicinas, galocitabinas, geroquinoles, gimatecanos, gimeracilos, gloxazonas, glufosfamidas, ilmofoquinas, ilomastats, imexonas, improsulfanos, indisulams, inproquonas, interleucinas, interleucinas-2, interleucinas recombinantes, intoplicinas, lobenguanos, ioproplatinos, irsogladinas, ixabepilonas, ketotrexatos, L-alanosinas, lanreotidas, lapatinibs, ledoxantronas, leuprolidas, leuprorelinas, lexacalcitoles, liarozoles, lobaplatinos, lometrexoles, lonafarnibs, losoxantronas, lurtotecanos, mafosfamidas, manosulfanos, marimastats, masoprocoles, maitansinas, mecloretaminas, melengestroles, melfalano, menogarilos, mepitiostanos, metesinds, metomidatos, metoprinas, meturedepas, miboplatinos, miproxifeno, misonidazoles, mitindomidás, mitocarcinas, mitocrominas, mitoflaxonas, mitogilinas, mitoguaconas, mitomalcinas, mitonafidas, mitoquidonas, mitospers, mitozolomidas, mivobulinas, mizoribinas, mofaroteno, mopidamoles, mubritinibs, ácidos micofenólicos, nedaplatinos, neizarabinas, nemorubicinas, nitracrinas,

nocodazoles, nogalamincinas, nolatrexedes, nortopixantronas, ormaplatinos, ortataxeles, oteracilos, oxisuranos, oxofenarsinas, patubilonas, peldesinas, peliomicinas, pelitrexoles, pemetrexeds, pentamustinas, peplomicinas, perfosfamidas, perifosinas, picoplatinos, pinafidas, pivosulfanos, pifenidonas, piroxantronas, pixantronas, plevitrexeds, plomestanos, porfiroomicinas, prednimustinas, propamidinas, prospidios, pumitepas, puromicinas,
 5 pirazofurinas, ranimustinas, riboprinas, ritrosulfanos, rogletimidias, roquinimexs, rufocromomicinas, sabarubicinas, safingoles, satraplatinos, sebriplatinos, semustinas, simtrazenos, sizofiranos, sobuzoxanos, sorafenibs, esparfosatos, ácidos esparfósicos, esparsomicinas, espirogermanios, espiromustinas, espiroplatinos, esqualaminas, estreptonigrinas, estreptovarincinas, sufosfamidas, sulofenurs, tacedinalinas, talisomicinas, talimustinas, tariquidars, tauromustinas, tecogalanos, tegafurs, teloxantronas, temoporfinas, teroxironas, tiamiprinas, tiamiprinas, tiazofurinas,
 10 tilomisoles, tiloronas, timcodars, timonacics, tirapazaminas, topixantronas, trabectedinas, ecteinascidina 743, trestolonas, tricirbinas, trilostanos, trimetrexatos, tetranitratos de triplatino, triptorelinas, trofosfamida, tubulozoles, ubenimexs, uredepas, valspodars, vaporeotidas, verteporfinas, vinblastinas, vindesinas, vinepidinas, vinfluninas, vinformidas, vinglicinatos, vinleucinoles, vinleurosinas, vinrosidinas, vintriptoles, vinzolidinas, vorozoles, xantomincinas A, guameciclinas, zeniplatinos, zilascorbs [2-H], zinostatinas, zorubicinas, zosuquidars, acetazolamidas, aciclovirs, adipiodonas, alatrofloxacinos, alfentanilos, extractos alérgicos, inhibidores de alfa 1-proteinas, alprostadios, amikacinas, aminoácidos, ácidos aminocaproico, aminofilinas, amitriptilinas, amobarbitales, amrinonas, analgésicos, vacunas anti-poliomielíticas, sueros anti-rábicos, inmunoglobulinas anti-tétanos, vacunas contra el tétanos, antitrombinas III, sueros antiveneno, argatrobanos, argininas, ácidos ascórbicos, atenololes, atracurios, atropinas, aurotioglucosas, azatioprinas, aztreonams, bacitracinas, baclofenos, basiliximabs, ácidos benzoicos, benzotropinas,
 20 betametasonas, biotinas, bivalirudinas, antitoxinas del botulismo, bretilios, bumetanidas, bupivacaínas, buprenorfinas, butorfanoles, calcitoninas, calcitrioles, calcio, capreomicinas, carboprostos, carnitinas, cefaniandoles, cefoperazonas, cefotaximas, cefoxitinas, ceftizoximas, cefuroximas, cloranfenicoles, cloroprocaínas, cloroquinás, clorotiazidas, clorpromazinas, ácidos condroitinsulfúricos, coriagonadotropina alfa, cromios, cidofovirs, cimetidinas, ciprofloxacinos, cisatracurios, clonidinas, codeínas, colchicinas, colistinas, colágenos, triflutatos ovinos de corticorelina, corticotrofinas, cosintropinas, cianocobalaminas, ciclosporinas, cisteína, dacliximabs, dalfopristinas, dalteparinas, danaparoides, dantrolenos, deferroxaminas, desmopresinas, dexametasonas, dexmedetomidinas, dexpantenoles, dextranos, dextranos de hierro, ácidos diatrizoicos, diazepams, diazóxideos, diciclominas, digibinds, digoxinas, dihidroergotaminas, diltiazems, difenhidraminas, dipiridamoles, dobutaminas, dopaminas, doxacurios, doxaprams, doxercalciferoles, doxiciclinas, droperidoles, difilinas, ácidos edéticos, edrofonios, enalaprilatos,
 30 efedrinas, epoprostenoles, ergocalciferoles, ergonovinas, ertapenems, eritromicinas, esmololes, estradioles, estrogénicos, ácidos etacrínicos, etanolaminas, etanoles, aceites etiodizados, ácidos etidrónicos, etomidatos, factores VIII, famotidinas, fenoldopamas, fentanilos, flumazenilos, fluoresceínas, flufenazinas, ácidos fólicos, fomepizoles, fomivirsenos, fondaparinuxs, foscarnets, fosfenitoínas, furosemidas, gadoteridoless, gadoversetamidas, ganciclovirs, gentamicinas, glucagones, glucosas, glicinas, glicopirrolatos, gonadorelinas, gonadotropina coriónica, polisacáridos de Haemophilus B, heminas, productos fitoterápicos, histaminas, hidralazinas, hidrocortisonas, hidromorfonas, hidroxocobalaminas, hidroxizinas, hiosciaminas, ibutilidas, imiglucerasas, carmines de índigo, indometacinas, yoduros, lopromidas, ácidos totalámicos, ácidos loxáglicos, loxilanos, isoniazidas, isoproterenoles, vacunas contra la encefalitis japonesa, kanamicinas, ketaminas, labetaloles, lepirudinas, levobupivacaínas, levotiroxinas, lincomincinas, liotironinas, hormonas luteinizantes, vacunas contra la enfermedad de Lyme,
 40 mangafodipirs, manthtoles, vacunas de polisacáridos meningocócicos, meperidinas, mepivacaínas, mesoridazinas, metaraminoles, metadonas, metocarbamoles, metohexitales, metildopatos, metilergonovinas, metoclopramidias, metoprololes, metronidazoles, minociclinas, mivacurios, ácidos morruicos, moxifloxacinos, muromonab-CD3, micofenolatos mofetilos, nafcilinas, nalbufinas, nalmefenos, naloxonas, neostigminas, niacinamidas, nicardipinas, nitroglicerinas, nitroprusiatis, norepinefrinas, orfenadrinas, oxacilinas, oximorfonas, oxitetraciclinas, oxitocinas,
 45 pancuronios, pantenoles, ácidos pantoténicos, papaverinas, peginterferón-alfa (por ejemplo interferón alfa 2a o 2b), penicilinas G, pentamidinas, pentazocinas, pentobarbitales, perfiutrenos, perfenazinas, fenobarbitales, fentolaminas, fenilefrinas, fenitoínas, fisostigminas, fitonadionas, polimixinas B, pralidoximas, prilocaínas, procainamidas, procaínas, proquiorperazinas, progesteronas, propranololes, hidróxidos de piridostigmina, piridoxinas, quinidinas, quinupristinas, inmunoglobulinas contra la rabia, vacunas contra la rabia, ranitidinas, remifentanilos, riboflavinas, rifampinas, ropivacaínas, samarios, escopolaminas, selenios, sermorelinas, sincalidas, somatremis, espectinomincinas, estreptocinasas, estreptomincinas, succinilcolinas, sufentanilos, sulfametoxazoles, tacrolimus, terbutalinas, teriparatidas, testosteronas, antitoxinas del tétanos, tetracaínas, sulfatos de tetradecilo, teofilinas, tiaminas, tietilperazinas, tiopentales, hormonas estimulantes del tiroides, tinzaparinas, tirofibanos, tobramicinas, tolazolinas, tolbutamidas, torsemidas, ácidos tranexámicos, treprostínulos, trifluoperazinas, trimetobenzamidas,
 55 trimetoprims, trometaminas, tuberculinas, vacunas tifoideas, urofolitropinas, urocinasas, ácidos valproicos, vasopresinas, vecuronios, verapamilos, voriconazoles, warfarinas, vacunas contra la fiebre amarilla, zidovudinas, zinc, clorhidratos de ziprasidona, aclacinomicinas, actinomicinas, adriamicinas, azaserinas, 6-azauridinas, carzinofilinas, cromomicinas, denopterinas, 6-diazo-5-oxo-L-norleucinas, enocitabinas, loxuridinas, olivomicinas, pirarubicinas, piritrexims, pteropterinas, tagafurs, tubercidinas, alteplazas, arcitumomab, bevacizumab, toxina botulínica tipo A, toxina botulínica tipo B, capromab pendetidas, daclizumabs, dornasas alfa, drotrecoginas alfa, imciromab pentetatos y yodo-131.

En particular, los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, interferón beta, interferones alfa-2a, interferones alfa-1, interferones alfa-n3, interferón beta-1, interferones beta-1a, interferones gamma-1b,
 65 peginterferón alfa-2 y peginterferones alfa-2b, insulina, un bisfosfato (por ejemplo pamidronatos o zoledronatos), docetaxeles, doxorubicinas, doxorubicinas liposomales y bevacizumabs.

2. Uso para eliminar glicosaminoglicanasas en exceso

Se proporcionan en el presente documento métodos para tratar enfermedades y estados asociados a hialuronano mediante la administración de una composición que contiene una PH20 soluble, normalmente una hialuronidasa soluble o bien sola o bien en combinación con o además de otro tratamiento y/o agente. Enfermedades y estados asociados a hialuronano son enfermedades y estados en los que los niveles de hialuronano están elevados como causa, consecuencia u observados de otra forma en la enfermedad o el estado, y pueden tratarse mediante la administración de una composición de hialuronidasas, tales como una PH20 soluble, o bien solas o bien en combinación con o además de otro tratamiento y/o agente.

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

En algunos casos, las enfermedades y los estados asociados a hialuronano están asociados con presión de fluido intersticial aumentada, disminución del volumen vascular y/o aumento del contenido en agua en un tejido, tal como un tumor. En un ejemplo, el tratamiento con las composiciones y los compuestos proporcionados en el presente documento mejora uno o más de estos síntomas u otros síntomas asociados con la enfermedad o el estado, por ejemplo, mejora la supervivencia o calidad de vida del sujeto a lo largo del tiempo, o inhibe el crecimiento tumoral.

Las enfermedades y los estados asociados a hialuronano a modo de ejemplo que pueden tratarse usando las enzimas, las composiciones y los métodos proporcionados, incluyen, pero no se limitan a, cánceres ricos en hialuronano, por ejemplo, tumores, incluyendo tumores sólidos tales como cánceres en estadio tardío, cánceres metastásicos, cánceres no diferenciados, cáncer de ovario, carcinoma *in situ* (ISC), carcinoma de células escamosas (SCC), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de colon y otros cánceres.

También enfermedades y estados asociados a hialuronano a modo de ejemplo son enfermedades que están asociadas con presión de fluido intersticial elevada, tal como enfermedades asociadas con presión de disco, y edema, por ejemplo, edema provocado por trasplante de órganos, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico o otra lesión. Las enfermedades y los estados asociados a hialuronano a modo de ejemplo incluyen enfermedades y estados asociados con presión de fluido intersticial elevada, disminución del volumen vascular, y/o aumento del contenido en agua en un tejido, incluyendo cánceres, presión de disco y edema. En un ejemplo, el tratamiento del estado, la enfermedad o el trastorno asociado a hialuronano incluye mejora, reducción u otro efecto beneficioso sobre uno o más de presión de fluido intersticial aumentada (IFP), disminución del volumen vascular y aumento del contenido en agua en un tejido.

Normalmente, la enfermedad o el estado asociado a hialuronano está asociado con expresión de HA aumentada, por ejemplo, en un tejido enfermo, por ejemplo, un tumor. En un ejemplo, se forman HALO (regiones de matriz pericelular que son ricas en proteoglicanos, incluyendo hialuronano) en un tejido del sujeto, por ejemplo, en un tejido enfermo. En otro ejemplo, se detecta la presencia de HALO en un cultivo *in vitro* de células de un tejido del sujeto, por ejemplo, un tejido enfermo.

a. Uso en el tratamiento del cáncer

La hialuronidasa tiene efectos anticarcinogénicos directos por la degradación de ácido hialurónico en tumores. Por tanto, pueden usarse hialuronidasas PH20 solubles, tales como esPH20, para tratar tumores, en particular, tumores

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

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

Las hialuronidasas pueden también usarse para aumentar la sensibilidad de los tumores que son resistentes a la quimioterapia convencional. Por ejemplo, puede administrarse una hialuronidasa, tal como PH20 soluble, a un paciente que tiene un tumor asociado con un defecto de HYAL1 en una cantidad eficaz para aumentar la difusión alrededor del sitio tumoral (por ejemplo, para facilitar la circulación y/o concentraciones de agentes quimioterápicos en y alrededor del sitio tumoral), inhibir la movilidad de células tumorales, tal como mediante degradación de ácido hialurónico, y/o para disminuir el umbral de apoptosis de células tumorales. Esto puede llevar a la(s) célula(s) tumoral(es) a un estado de anoikis, que hace que célula tumoral sea más susceptible a la acción de agentes quimioterápicos. La administración de una hialuronidasa puede inducir receptividad de tumores previamente resistentes a la quimioterapia del páncreas, el estómago, el colon, lo ovarios y la mama (Baumgartner *et al.* (1988) *Reg. Cancer Treat.* 1:55-58; Zanker *et al.* (1986) *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 27:390). Por tanto, además del tratamiento de un cáncer con una PH20 soluble sola, las composiciones y los métodos proporcionados en el presente documento pueden también usarse para tratar cánceres asociados a hialuronano mediante la administración de una PH20 soluble en combinación con, por ejemplo, simultáneamente o antes de, un agente o tratamiento quimioterápico u otro anticancerígeno. En este ejemplo, la hialuronidasa, tal como una PH20 soluble, normalmente potencia la penetración de agentes quimioterápicos u otros agentes anticancerígenos en tumores sólidos, tratando de ese modo la enfermedad.

Pueden inyectarse composiciones que contienen PH20 soluble por vía intratumoral con agentes anticancerígenos o por vía intravenosa para cánceres diseminados o que es difícil que alcancen los tumores. El agente anticancerígeno puede ser un agente quimioterápico, un anticuerpo, un péptido o un vector, virus o ADN de terapia génica. Adicionalmente, puede usarse hialuronidasa para reclutar células tumorales en la reserva de ciclación para la sensibilización en tumores anteriormente quimiorrefractarios que han adquirido resistencia a múltiples fármacos (St Croix *et al.*, (1998) *Cancer Lett* September 131(1): 35-44).

Los agentes anticancerígenos a modo de ejemplo que pueden administrarse después, de manera coincidente con o antes de la administración de una PH20 soluble, tal como una esPH20, incluyen, pero no se limitan a acvicinas; aclarubicinas; acodazoles; acroninas; adozelesinas; aldesleucinas; alemtuzumabs; alitretinoínas (ácidos 9-cis-retinoicos); alopurinoles; altretaminas; alvocidibs; ambazonas; ambomicinas; ametantronas; amifostinas; aminoglutetimidas; amsacinas; anastrozoles; anaxironas; ancitabinas; antramincinas; apaziquonas; argimesnas; trióxidos arsénicos; asparaginasas; asperlinas; atrimustinas; azacitidinas; azetepas; azotomicinas; banoxantronas; batabulinas; batimastats; BCG vivo; benaxibinas; bendamustinas; benzodepas; bexaroteno; bevacizumab; bicalutamidas; bietaserpinas; biricodars; bisantrenos; bisantrenos; dimesilatos de bisnafida; bizelesinas; bleomicinas; bortezomibs; brequinaris; bropiriminas; budotitanos; busulfanos; cactinomicinas; calusteronas; canertinibs; capecitabinas; caracemidas; carbetímeros; carboplatinos; carboquonas; carmofurs; carmustinas con polifeprosanos; carmustinas; carubicinas; carzelesinas; cedefingoles; celecoxibs; cemadotinas; clorambucilos; cioteronels; cirolemicinas; cisplatinos; cladribinas; clanfenurs; clofarabinas; crisnatoles; ciclofosfamidas; citarabinas liposomales; citarabinas; dacarbazinas; dactinomicinas; darbeopetinas alfa; daunorubicinas liposomales; daunorubicinas/daunomicinas; daunorubicinas; decitabinas; denileucinas diftotox; dextrazoxanos; dexrazoxanos; dezaguaninas; diaziquonas; dibrospidios; dienogests; dinalinas; disermolidas; docetaxeles; dofequidars; doxifluridinas; doxorubicinas liposomales; doxorubicina HCl; inyección de liposomas de docorubicina HCl; doxorubicinas; droloxifenos; propionatos de dromostanolona; duazomicinas; ecomustinas; edatrexatos; edotecarinas; eflornitinas; elacridars; elinafidas; disoluciones B de Elliot; elsamitricinas; emitefurs; enloplatinos; enpromatos; enzastaurinas; epipropidinas; epirubicinas; epoetinas alfa; eptaloprosts; erbulozoles; esorubicinas; estramustinas; etanidazoles; etoglúcidos; fosfatos de etopósido; etopósidos VP-16; etopósidos; etoprinas; exemestanos; exisulinds; fadrozoles; fazarabinas; fenretinidas; filgrastims; floxuridinas; fludarabinas; fluorouracilos;

5-fluorouracilos; fluoximesterona; flurocitabinas; fosquidonas; fostriecinas; fostriecinas; fotretaminas; fulvestrants; galarubicinas; galocitabinas; gemcitabinas; gemtuzumabs/ozogamicinas; geroquinoles; gimatecanos; gimeracilos; gloxazonas; glufosfamidas; acetatos de goserelina; hidroxureas; ibritumomabs/tiuxetanos; idarubicinas; ifosfamidas; ilfosfosinas; ilomastats; mesilatos de imatinib; imexonas; improsulfanos; indisulams; inproquonas; interferones alfa-2a; interferones alfa-2b; interferones alfa; interferones beta; interferones gamma; interferones; interleucinas-2 y otras interleucinas (incluyendo interleucinas recombinantes); intoplicinas; lobenguanos [131-I]; ioplatinos; irinotecanos; irsogladinas; ixabepilona; ketotrexatos; L-alaninas; lanreotidas; lapatinibs; ledoxantrona; letrozoles; leucovorinas; leuprolidas; leuprorelinas (leuprorelidas); levamisoles; lexacalcitoles; liarozoles; lobaplatinos; lometrexoles; lomustinas/CCNU; lomustinas; lonafarnibs; losoxantrona; lurtotecanos; mafosfamidas; manosulfanos; marimastats; masoprocoles; maitansinas; mecloretaminas; mecloretaminas/mostazas de nitrógeno; acetatos de megestrol; megestroles; melengestroles; melfalanos; malfalanos L-PAM; menogarilos; mepitiostanos; mercaptopurinas; 6-mercaptopurina; mesnas; metesinds; metotrexatos; metoxsalenos; metomidatos; metoprinas; meturedepas; miboplatinos; miproxifenos; misonidazoles; mitindomidas; mitocarcinas; mitocrominas; mitofloxonas; mitogilinas; mitoguazonas; mitomalcinas; mitomicinas C; mitomicinas; mitonafidas; mitoquidonas; mitopers; mitotanos; mitoxantrona; mitozolomidas; mivobulinas; mizoribinas; mofaroteno; mopidamoles; mubritinibs; ácidos micofenólicos; fenpropionatos de nandrolona; nedaplatinos; nelzarabinas; nemorubicinas; nitracinas; nocodazoles; nofetumomabs; nogalamincinas; nolatrexed; nortopixantrona; octreotidas; oprelvekinas; ormaplatinos; ortataxeles; oteracilos; oxaliplatinos; oxisuranos; oxofenarsinas; paclitaxeles; pamidronatos; patubilonas; pegademasa; pegaspargasa; pegfilgrastims; peldesinas; peliomincinas; pelitrexoles; pemetrexeds; pentamustinas; pentostatinas; peplomincinas; perfosfamidas; perfosinas; picoplatinos; pinafidas; pipobromanos; piposulfanos; pirfenidona; piroxantrona; pixantrona; plevitrexeds; mitramincinas plicamicidas; plicamicinas; plomestanos; plomestano; porfirimeros sódicos; porfirimeros; porfiromicinas; prednimustinas; procarbazonas; propamidinas; prospidios; pumitepas; puromincinas; pirazofurinas; quinacinas; ranimustinas; rasburicasas; riboprinas; ritrosulfanos; rituximabs; rogletimidas; roquinimex; rufocromomicinas; sabarubicinas; safingoles; sargramostims; satraplatinos; sebriplatinos; semustinas; simtrazenos; sizofiranos; sobuzoxanos; sorafenibs; esparfosatos; ácidos esparfósicos; esparsomicinas; espirogermanios; espiromustinas; espiroplatinos; espiroplatinos; esculaminas; estreptonigrinas; estreptovarinas; estreptozocinas; sufosfamidas; sulofenurs; malato de sunitinib; 6-TG; tacedinalinas; talcos; talisomicinas; talimustinas; tamoxifenos; tariquidas; taumustinas; tecogalanos; tegafurs; teloxantrona; temoporfinas; temozolomidas; tenipósidos/VM-26; tenipósidos; teroxironas; testolactonas; tiamiprinas; tioguaninas; tiotepas; tiamiprinas; tiazofurinas; tilomisoles; tiloronas; timcodars; timonacics; tirapazaminas; topixantrona; topotecanos; toremifenos; tositumomabs; trabectedinas (ecteinascidina 743); trastuzumabs; trestolona; tretinoína/ATRA; triciribinas; trilostanos; trimetrexatos; tetranitratos de triplatino; triptorelinas; trofosfamidas; tubulozoles; ubenimex; mostazas de uracilo; uredepas; valrubicinas; valspodars; vaporetidas; verteporfinas; vinblastinas; vincristinas; vindesinas; vinepidinas; vinfluninas; vinformidas; vinglicinatos; vinleucinoles; vinleurosinas; vinorelbina; vinrosidinas; vintriptoles; vinzolidinas; vorozoles; xantomincinas A (guameciclinas); zeniplatinos; zilascorb [2-H]; zinostatinas; zoledronato; zorubicinas; y zosuquidars, por ejemplo:

aldesleucinas (por ejemplo PROLEUKIN®); alemtuzumabs (por ejemplo CAMPATH®); alitretinoína (por ejemplo PANRETIN®); alopurinoles (por ejemplo ZILOPRIM®); altretaminas (por ejemplo HEXALEN®); amifostinas (por ejemplo ETHYOL®); anastrozoles (por ejemplo ARIMIDEX®); trióxidos arsénicos (por ejemplo TRISENOX®); asparaginasas (por ejemplo ELSPAR®); BCG vivo (por ejemplo TICE® BCG); bexaroteno (por ejemplo TARGRETIN®); bevacizumab (AVASTIN®); bleomicinas (por ejemplo BLENOXANE®); busulfano intravenoso (por ejemplo BUSULFEX®); busulfanos orales (por ejemplo MILERAN™); calusterona (por ejemplo METOSARB®); capecitabinas (por ejemplo XELODA®); carboplatinos (por ejemplo PARAPLATIN®); carmustinas (por ejemplo BCNU®, BiCNU®); carmustinas con polifeprosanos (por ejemplo GLIADEL® Wafer); celecoxibs (por ejemplo CELEBREX®); clorambucilos (por ejemplo LEUKERAN®); cisplatinos (por ejemplo PLATINOL®); cladribinas (por ejemplo LEUSTATIN®, 2-CdA®); ciclofosfamidas (por ejemplo CYTOXAN®, NEOSAR®); citarabinas (por ejemplo CYTOSARU®); citarabinas liposomales (por ejemplo DepoCyt®); dacarbazinas (por ejemplo DTIC-Domeu); dactinomincinas (por ejemplo COSMEGEN®); darbeopetinas alfa (por ejemplo ARANESP®); daunorubicinas liposomales (por ejemplo DANUOXOME®); daunorubicinas/daunomicinas (por ejemplo CERUBIDINE®); denileucinas difitox (por ejemplo ONTAK®); dextrazoxanos (por ejemplo ZINECARD®); docetaxeles (por ejemplo TAXOTERE®); doxorubicinas (por ejemplo ADRIAMYCIN®, RUBEX®); doxorubicinas liposomales, incluyendo inyecciones liposomales de docorubicina HCL (por ejemplo DOXIL®); propionatos de dromostanolona (por ejemplo inyección DROMOSTANOLONE® y MASTERONE®); disoluciones b de Elliot (por ejemplo Elliott's B Solution®); epirubicinas (por ejemplo ELLENCE®); epoetinas alfa (por ejemplo EPOGEN®); estramustinas (por ejemplo EMCYT®); fosfatos de etopósido (por ejemplo ETOPOPHOS®); etopósidos VP-16 (por ejemplo VEPESID®); exemestanos (por ejemplo AROMASIN®); filgrastims (por ejemplo NEUPOGEN®); floxuridinas (por ejemplo FUDR®); fludarabinas (por ejemplo FLUDARA®); fluorouracilos incluyendo 5-FU (por ejemplo ADRUCIL®); fulvestrants (por ejemplo FASLODEX®); gemcitabinas (por ejemplo GEMZAR®); gemtuzumabs/ozogamicinas (por ejemplo MILOTARG®); acetatos de goserelina (por ejemplo ZOLADEX®); hidroxureas (por ejemplo HYDREA®); ibritumomabs/tiuxetanos (por ejemplo ZEVALIN®); idarubicinas (por ejemplo IDAMYCIN®); ifosfamidas (por ejemplo IFEX®); mesilatos de imatinib (por ejemplo GLEEVEC®); interferones alfa-2a (por ejemplo ROFERON-A®); interferones alfa-2b (por ejemplo INTRON A®); irinotecanos (por ejemplo CAMPTOSAR®); letrozoles (por ejemplo FEMARA®); leucovorinas (por ejemplo WELLCOVORIN®, LEUCOVORIN®); levamisoles (por ejemplo ERGAMISOL®); lomustinas/CCNU (por ejemplo CeeBU®); mecloretaminas/mostazas de nitrógeno (por ejemplo MUSTARGEN®); acetatos de megestrol (por ejemplo MEGACE®); melfalanos/L-PAM (por ejemplo ALQUERAN®);

mercaptapurina incluyendo 6-MP (por ejemplo PURINETOL®); mesnas (por ejemplo MESNEX®); metotrexatos; metoxsalenos (por ejemplo UVADEX®); mitomicinas C (por ejemplo MUTAMYCIN®, MITOZYTREX®); mitotanos (por ejemplo LYSODREN®); mitoxantronas (por ejemplo NOVANTRONE®); fenpropionatos de nandrolona (por ejemplo DURABOLIN-50®); nofetumomabs (por ejemplo VERLUMA®); oprelvequinas (por ejemplo NEUMEGA®); oxaliplatinos (por ejemplo ELOXATIN®); paclitaxeles (por ejemplo PAXENE®, TAXOL®); pamidronatos (por ejemplo AREDIA®); pegademazas (por ejemplo ADAGEN®); pegaspargasas (por ejemplo ONCASPAR®); pegfilgrastims (por ejemplo NEULASTA®); pentostatinas (por ejemplo NIPENT®); pipobromanos (por ejemplo VERCYTE®); plicamicina/mitramicinas (por ejemplo MITHRACIN®); porfímeros sódicos (por ejemplo PHOTOFRIN®); procarbazinas (por ejemplo MATULANE®); quinacrinas (por ejemplo ATABRINE®); rasburicasas (por ejemplo ELITEK®); rituximabs (por ejemplo RITUXAN®); sargramostims (por ejemplo PROKINE®); estreptozocinas (por ejemplo ZANOSAR®); malatos de sunitinib (por ejemplo SUTENT®); talcos (por ejemplo SCLEROSOL®); tamoxifenos (por ejemplo NOLVADEX®); temozolomidas (por ejemplo TEMODAR®); tenipósidos/VM-26 (por ejemplo VUMON®); testolactonas (por ejemplo TESLAC®); tioguaninas incluyendo 6-TG; tiotepas (por ejemplo TIOPLEX®); topotecanos (por ejemplo HYCAMTIN®); toremifenos (por ejemplo FARESTON®); tositumomabs (por ejemplo BEXXAR®); trastuzumabs (por ejemplo HERCEPTIN®); tretinoínas/ATRA (por ejemplo VESANOID®); mostazas de uracilo; valrubicinas (por ejemplo VALSTAR®); vinblastinas (por ejemplo VELBAN®); vincristinas (por ejemplo ONCOVIN®); vinorelbina (por ejemplo NAVELBINE®); y zoledronatos (por ejemplo ZOMETA®).

En un ejemplo, una PH20 soluble, tal como una esPH20, por ejemplo, rHuPH20 pegilada, se administra a un sujeto después, de manera coincidente con o antes de la administración de uno o más de docetaxel (por ejemplo TAXOTERE®), doxorubicina liposomal (por ejemplo DOXIL®), malato de sunitinib (por ejemplo SUTENT®) o bevacizumab (AVASTIN®).

Por tanto, pueden usarse polipéptidos de PH20 soluble proporcionados en el presente documento en el tratamiento de cánceres metastásicos y no metastásicos, incluyendo los que tienen actividad hialuronidasa endógena disminuida en relación con células no cancerosas. Pueden usarse hialuronidasas como agente quimioterápico solo o en combinación con otros agentes quimioterápicos. Los cánceres a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células escamosas, y cánceres de la mama, los ovarios, de cabeza y cuello, o cualquier otro cáncer asociado con niveles deprimidos de actividad hialuronidasa o catabolismo de ácido hialurónico disminuido.

b. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicano en el cerebro

Los niveles de ácido hialurónico están elevados en varios estados patológicos cerebroespinales. Los niveles de ácido hialurónico cerebroespinal son normalmente inferiores a 200 µg/l en adultos (Laurent *et al.* (1996) *Acta Neurol Scand* September 94(3):194-206), pero pueden elevarse hasta niveles por encima de 8000 µg/l en enfermedades tales como meningitis, estenosis espinal, lesión craneal e infarto cerebral. Pueden utilizarse hialuronidasas, tales como, por ejemplo, rHuPH20 soluble, para degradar los niveles de sustrato elevados de manera crítica.

La falta de un sistema linfático eficaz en el cerebro puede también conducir a edema potencialmente mortal tras traumatismo craneoencefálico. La acumulación de ácido hialurónico es un resultado del aumento de la síntesis por ácido hialurónico sintetas y la disminución de la degradación. La acumulación de ácido hialurónico puede servir inicialmente para el fin beneficioso de aumentar el contenido en agua en el tejido dañado para facilitar la extravasación de leucocitos, pero la acumulación continuada puede ser mortal. La administración de hialuronidasa, tal como por vía intratecal o por vía intravenosa, a un paciente que padece traumatismo craneoencefálico puede servir para eliminar la acumulación de ácido hialurónico tisular y el agua asociado con el mismo.

Puede también usarse PH20 soluble en el tratamiento de edema asociado con tumores cerebrales, particularmente el asociado con glioblastoma multiforme. El edema asociado con tumores cerebrales resulta de la acumulación de ácido hialurónico en las partes no cancerosas del cerebro adyacente al tumor. La administración de una hialuronidasa PH20 soluble a los sitios de acumulación de ácido hialurónico (por ejemplo, mediante inyección intravenosa o por medio de una derivación) puede aliviar el edema asociado con tales tumores malignos degradando el ácido hialurónico en exceso en estos sitios.

c. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicano en enfermedad cardiovascular

Pueden usarse hialuronidasas PH20 solubles en el tratamiento de algunas enfermedades cardiovasculares. La administración de hialuronidasa en modelos animales tras infarto de miocardio experimental puede reducir el tamaño del infarto (Maclean, *et al.* (1976) *Science* 194(4261):199-200). Un mecanismo propuesto mediante el cual puede producirse esto es por la reducción de la acumulación de ácido hialurónico que se produce tras la isquemia-reperfusión. Se cree que la reducción del tamaño del infarto se produce a partir del aumento del drenaje linfático y el aumento de la oxigenación tisular y la reducción del contenido en agua del miocardio.

Pueden también usarse hialuronidasas PH20 solubles para limitar las placas coronarias de la arteriosclerosis. Tales placas acumulan glicosaminoglicanos y median en la adhesión de macrófagos y células espumosas (Kolodgie *et al.* (2002) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22(10):1642-8).

d. Uso en vitrectomía y trastornos y estados oftálmicos

5 Puede usarse hialuronidasa, tal como una PH20 soluble, para minimizar el desprendimiento o desgarro de la retina durante vitrectomía. Esto podría provocar, por ejemplo, que el cuerpo vítreo se desacople o “se desinserte” de la retina, antes de la retirada del cuerpo vítreo. Tal desinserción o desacoplamiento del cuerpo vítreo puede minimizar la probabilidad de que se produzca desgarro o desprendimiento adicional de la retina a medida que se retira el cuerpo vítreo.

10 Puede usarse hialuronidasa, tal como una PH20 soluble, para diversas aplicaciones oftálmicas, incluyendo la aplicación adjunta de vitrectomía descrita en la patente estadounidense n.º 5.292.509. El uso de una hialuronidasa altamente purificada, tal como, por ejemplo, PH20 soluble proporcionada en el presente documento, es preferible para procedimientos intraoculares para minimizar la inmunogenicidad y toxicidad.

15 Pueden usarse hialuronidasas PH20 solubles para tratar y/o prevenir trastornos oftálmicos mediante, por ejemplo, la prevención de la neovascularización el aumento de la tasa de aclaramiento del humor vítreo de materiales tóxicos para la retina. Puede administrarse una hialuronidasa PH20 soluble en una cantidad eficaz para licuar el humor vítreo del ojo sin provocar daño tóxico al ojo. La licuefacción del humor vítreo aumenta la tasa de intercambio líquido de la cámara vítrea. Este aumento en el intercambio elimina los materiales contaminantes cuya presencia puede provocar daño oftalmológico y retiniano.

20 Pueden también usarse hialuronidasas PH20 solubles para reducir la presión posoperatoria. Se ha usado ácido hialurónico en el ojo principalmente como espaciador durante procedimientos quirúrgicos de cataratas y lentes intraoculares. También se usa en otros procedimientos quirúrgicos oculares tales como glaucoma, cirugía vítrea y de la retina y en trasplante de córnea. Un efecto secundario común que se produce en pacientes con cataratas posoperatorios es un aumento temprano significativo, y ocasionalmente prolongado, en la presión intraocular. Un estado de este tipo es algunas veces grave, especialmente en pacientes con cambios de disco óptico glaucomatoso. Puede administrarse conjuntamente hialuronidasa, tal como PH20 soluble, con ácido hialurónico al ojo antes de la cirugía para reducir la presión posoperatoria en el ojo. La hialuronidasa se administra en una cantidad eficaz para reducir la presión intraocular hasta niveles preoperatorios descomponiendo el ácido hialurónico sin disminuir su eficacia durante la cirugía ni provocando efectos secundarios en el paciente (patente estadounidense n.º 6.745.776).

25 Pueden también administrarse hialuronidasas PH20 solubles a pacientes con glaucoma para eliminar glicosaminoglicanos de la malla trabecular y reducir la presión intraocular, y puede aplicarse al humor vítreo para promover la resolución de hemorragias vítreas (es decir extravasación de la sangre al humor vítreo), que pueden producirse en relación con estados tales como retinopatía diabética, neovascularización de la retina, oclusión de venas de la retina, desprendimiento vítreo posterior, desgarros de la retina, traumatismos oculares y similares. La presencia de hemorragias vítreas, que normalmente se resuelven lentamente, puede retrasar, complicar o impedir procedimientos que requieren que se visualice la retina a través del humor vítreo para el diagnóstico y/o para procedimientos de tratamiento tales como fotocoagulación con láser y similares que son a menudo tratamientos primarios para estados tales como retinopatía diabética proliferativa.

e. Uso en hipodermocclisis

45 La hipodermocclisis, la infusión de fluidos y electrolitos en la hipodermis de la piel, es una técnica de hidratación útil y sencilla adecuada para pacientes adultos deshidratados de manera leve a moderada, especialmente los ancianos. Aunque se considera segura y eficaz, el efecto adverso más frecuente es edema subcutáneo leve que puede tratarse mediante masaje local o diuréticos sistémicos. Pueden administrarse aproximadamente 3 l en un periodo de 24 horas en dos sitios separados. Los sitios de infusión comunes incluyen el tórax, el abdomen, los muslos y las extremidades superiores. Las disoluciones usadas en hipodermocclisis incluyen, por ejemplo, solución salina normal, solución salina seminormal, glucosa con solución salina y glucosa al 5%. Puede también añadirse cloruro de potasio a la disolución. La adición de una hialuronidasa, tal como una PH20 soluble, a la disolución puede potenciar la absorción de fluido y aumentar la tasa de administración global.

f. Uso en terapia génica

55 La eficacia de la mayoría de los vehículos de suministro génico *in vivo* no se corresponde con la eficacia encontrada observada *in vitro*. Los glicosaminoglicanos pueden dificultar la transferencia y difusión de ADN y vectores virales en muchos tipos de células. Los niveles de tal material de la matriz extracelular pueden dificultar el proceso considerablemente. La administración de hialuronidasa, tal como una PH20 soluble, puede abrir canales en la matriz extracelular, potenciando así el suministro de terapia génica. Por ejemplo, puede administrarse PH20 soluble con colagenasa para facilitar la transducción de ADN *in vivo* (Dubensky *et al.* (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81(23):7529-33). La hialuronidasa puede también potenciar la terapia génica usando virus adenoasociado (Favre *et al.* (2000) Gene Therapy 7(16):1417-20). Los canales abiertos tras la administración de hialuronidasa son de un tamaño que normalmente potencia la difusión de moléculas más pequeñas tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y complejos de ADN (así como otros agentes terapéuticos y farmacológicos de interés). Sin

embargo, los poros no son tan grandes como para promover la dislocación y el movimiento de las células.

En algunos ejemplos, pueden modificarse por ingeniería genética virus para expresar hialuronidasa, tal como una PH20 soluble, para facilitar su replicación y extensión dentro de un tejido diana. El tejido diana puede ser, por ejemplo, un tejido canceroso mediante lo cual el virus puede replicarse selectivamente dentro del tumor. El virus puede también ser un virus no lítico en el que el virus se replica selectivamente bajo un promotor específico de tejido. A medida que los virus se replican, la coexpresión de hialuronidasa con genes virales puede facilitar la extensión del virus *in vivo*.

g. Usos cosméticos

Pueden administrarse hialuronidasas, tales como una PH20 soluble, para eliminar glicosaminoglicanos implicados en la acumulación de celulitis y para promover el flujo linfático. Por ejemplo, puede usarse PH20 soluble para el tratamiento de celulitis. La hialuronidasa puede administrarse a través de inyecciones subcutáneas repetidas, a través de administración transdérmica en forma de pomadas o cremas o a través del uso de formulaciones inyectables de liberación lenta para promover la degradación continua de glicosaminoglicanos e impedir su retorno.

Puede también usarse hialuronidasa, tal como una PH20 soluble, para tratar estados tales como edema de "piel de cerdo" o edema de "piel de naranja". Las hialuronidasas pueden afectar a la despolimerización de las cadenas de mucopolisacárido largas que pueden acumularse en la dermis y que son responsables de la retención de agua unidad y de la ralentización, por compresión capilar, de la difusión de líquidos orgánicos, que eliminan desechos metabólicos. Tal retención de agua y desechos asociada con sobrecarga de grasa de los lipocitos, constituye el edema de "piel de cerdo" o edema de "piel de naranja" clásico. La despolimerización puede cortar las cadenas largas de los mucopolisacáridos para dar cadenas más cortas, dando como resultado la eliminación del agua unida y desechos y la restauración de la circulación venosa y linfática, culminando en la desaparición del edema local.

h. Uso en trasplante de órganos

El contenido en ácido hialurónico en un órgano puede aumentar con la inflamación. Se ha observado un aumento en la concentración de ácido hialurónico en tejido de diferentes órganos caracterizados por lesión inflamatoria-inmunológica tal como alveolitis (Nettelblatt *et al.* (1991) *Am. Rev. Resp. Dis.* 139: 759-762) e infarto de miocardio (Waldenstrom *et al.* (1991) *J. Clin. Invest.* 88(5): 1622-1628). Otros ejemplos incluyen rechazo de aloinjerto tras un trasplante renal (Ha'llgren *et al.* (1990) *J. Exp. Med.* 171: 2063-2076; Wells *et al.* (1990) *Transplantation* 50: 240-243), de intestino delgado (Wallander *et al.* (1993) *Transplant. Int.* 6: 133-137) o cardíaco (Haellgren *et al.* (1990) *J Clin Invest* 85:668-673); o una inflamación del miocardio de origen viral (Waldenstrom *et al.* (1993) *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 277-282). La aparición de edemas intersticiales en relación con el injerto de un órgano constituye un grave problema en el campo de la cirugía de trasplantes. Los injertos con edemas intersticiales pueden hincharse hasta un grado tal que se pierde temporalmente la función. En algunos casos, el hinchamiento puede provocar la alteración del riñón, dando como resultado una hemorragia masiva. Pueden usarse hialuronidasas, tales como una PH20 soluble, para degradar los glicosaminoglicanos acumulados en un trasplante de órganos. La eliminación de tales glicosaminoglicanos promueve la eliminación de agua del injerto y por tanto potencia la función del órgano.

i. Uso en enfermedad pulmonar

Los niveles de ácido hialurónico en lavados broncoalveolares (BAL) de individuos normales están generalmente por debajo de 15 ng/ml. Los niveles de ácido hialurónico en BAL aumentan drásticamente en estados de dificultad respiratoria (Bjermer *et al.* (1987) *Br Med J (Clin Res Ed)* 295(6602):803-6). El aumento del ácido hialurónico en el pulmón puede impedir la difusión de oxígeno y el intercambio de gases así como activar respuestas de neutrófilos y macrófagos. Pueden administrarse preparaciones purificadas de PH20 soluble, tales como cualquiera proporcionada en el presente documento, mediante administración o bien pulmonar o bien intravenosa a pacientes que presentan tales estados para reducir los niveles de hialuronano. Pueden también administrarse hialuronidasas, tales como una PH20 soluble, a pacientes que padecen otras complicaciones pulmonares que están asociadas con glicosaminoglicanos elevados o para potenciar la administración de otras moléculas administradas conjuntamente al pulmón.

3. Otros usos

En ejemplos adicionales de su uso terapéutico, puede usarse hialuronidasa, tal como una PH20 soluble incluyendo esPH20 proporcionada en el presente documento, para fines tales como un antídoto para la necrosis local por la inyección paravenosa de sustancias necróticas tales como alcaloides de la vinca (Few *et al.* (1987) *Amer. J. Matern. Child Nurs.* 12, 23-26), tratamiento de quistes ganglionares (Paul *et al.* (1997) *J Hand Surg.* 22 (2): 219-21) y tratamiento de necrosis tisular debida a insuficiencia venosa (Elder *et al.* (1980) *Lancet* 648-649). Puede también usarse PH20 soluble para tratar quistes ganglionares (también conocidos como quiste de muñeca, quiste de la biblia o quiste del tendón dorsal), que son las masas de tejido blando más comunes de la mano y son sacos llenos de fluido que pueden sentirse por debajo de la piel.

Pueden usarse hialuronidasas, tales como PH20 soluble, en el tratamiento de lesión de la médula espinal mediante la degradación de proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG). Tras la lesión de la médula espinal, se producen cicatrices gliales que contienen CSPG por astrocitos. Los CSPG desempeñan un papel crucial en la inhibición del crecimiento axónico. Además, se ha mostrado que la expresión de CSPG aumenta tras la lesión del sistema nervioso central (SNC). Puede también utilizarse PH20 soluble para el tratamiento de discos con hernias en un proceso conocido como quimionucleólisis. La condroitinasa ABC, una enzima que escinde sustratos similares a los de la hialuronidasa, puede inducir la reducción de la presión intradiscal en la medula espinal lumbar. Hay tres tipos de lesiones de los discos. Un disco que sobresale en uno que está intacto pero abultado. En un disco extruido, la envuelta fibrosa se ha desgarrado el NP se ha salido, pero está todavía conectado al disco. En un disco secuestrado, un fragmento del NP se ha soltado del disco y está libre en el canal espinal. La quimionucleólisis normalmente es eficaz en discos que sobresalen y extruidos, pero no en lesiones de discos secuestrados.

I. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para fines ilustrativos sólo. La invención se define en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Generación de mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana

En este ejemplo, se generaron una serie de mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana. La hialuronidasa PH20 humana madura, o molécula de adhesión 1 de espermatozoides (SPAM1), contiene 474 aminoácidos mientras que los mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal maduros generados en este ejemplo oscilaban en longitud entre 472 aminoácidos y 415 aminoácidos.

Se sintetizaron oligonucleótidos de ADN que codificaban para mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana truncada desde el aminoácido A507 hasta el aminoácido K450 según protocolos de síntesis de ADN convencionales. La secuencia de ADN original era una hialuronidasa PH20 humana con codones optimizados, cuya secuencia de nucleótidos se expone en SEQ ID NO: 2. Esta hialuronidasa PH20 humana con codones optimizados contenía una secuencia de señal de inmunoglobulina kappa (IgK) heteróloga, expuesta en SEQ ID NO: 144. Adicionalmente, las secuencias contenían un sitio de restricción 5' NheI y uno 3' BamHI para permitir la clonación en el plásmido HZ24 (SEQ ID NO: 140). Las secuencias de nucleótidos de mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana se exponen en SEQ ID NO: 146-185 y 199-201. Se digirieron las secuencias de ADN sintéticas con las enzimas de restricción NheI y BamHI y se clonaron en un plásmido HZ24 digerido de manera similar para generar un plásmido SPAM1-HZ24 mutante para cada clon individual.

En la tabla 3 se exponen los mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana. Los mutantes de SPAM1 se identifican mediante los 4 aminoácidos en el extremo C-terminal de las proteínas. También se expone la longitud, en aminoácidos, de los mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal precursores y maduros.

| Tabla 3. Mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana. | | | | |
|--|-------------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| Mutante | Precursor (aminoácidos) | Precursor SEQ ID NO | Maduro (aminoácidos) | Maduro SEQ ID NO |
| SPAM1-VASL | 509 | 1 | 474 | 108 |
| SPAM1-SSVA | 507 | 3 | 472 | 55 |
| SPAM1-IISS | 505 | 4 | 470 | 56 |
| SPAM1-FLII | 503 | 5 | 468 | 57 |
| SPAM1-LFLI | 502 | 47 | 467 | 99 |
| SPAM1-ILFL | 501 | 6 | 466 | 58 |
| SPAM1-SILF | 500 | 48 | 465 | 100 |
| SPAM1-VSIL | 499 | 7 | 464 | 59 |
| SPAM1-IVSI | 498 | 49 | 463 | 101 |
| SPAM1-FIVS | 497 | 8 | 462 | 60 |
| SPAM1-TMFI | 495 | 9 | 460 | 61 |
| SPAM1-SATM | 493 | 10 | 458 | 62 |
| SPAM1-TLSA | 491 | 11 | 456 | 63 |
| SPAM1-PSTL | 489 | 12 | 454 | 64 |
| SPAM1-STLS | 490 | 13 | 455 | 65 |
| SPAM1-ASPS | 487 | 14 | 452 | 66 |
| SPAM1-YNAS | 485 | 15 | 450 | 67 |
| SPAM1-FYNA | 484 | 16 | 449 | 68 |
| SPAM1-IFYN | 483 | 17 | 448 | 69 |
| SPAM1-QIFY | 482 | 18 | 447 | 70 |

| | | | | |
|------------|-----|----|-----|----|
| SPAM1-PQIF | 481 | 19 | 446 | 71 |
| SPAM1-EPQI | 480 | 20 | 445 | 72 |
| SPAM1-EEPQ | 479 | 21 | 444 | 73 |
| SPAM1-TEEP | 478 | 22 | 443 | 74 |
| SPAM1-ETEE | 477 | 23 | 442 | 75 |
| SPAM1-METE | 476 | 24 | 441 | 76 |
| SPAM1-PMET | 475 | 25 | 440 | 77 |
| SPAM1-PPME | 474 | 26 | 439 | 78 |
| SPAM1-KPPM | 473 | 27 | 438 | 79 |
| SPAM1-LKPP | 472 | 28 | 437 | 80 |
| SPAMS-FLOP | 471 | 29 | 436 | 81 |
| SPAM1-AFLK | 470 | 30 | 435 | 82 |
| SPAM1-DAFL | 469 | 31 | 434 | 83 |
| SPAM1-IDAF | 468 | 32 | 433 | 84 |
| SPAM1-CIDA | 467 | 33 | 432 | 85 |
| SPAM1-VCID | 466 | 34 | 431 | 86 |
| SPAMI-GVCI | 465 | 35 | 430 | 87 |
| SPAM1-DGVC | 464 | 36 | 429 | 88 |
| SPAM1-IADG | 462 | 37 | 427 | 89 |
| SPAM1-VCIA | 460 | 38 | 425 | 90 |
| SPAM1-VDVC | 458 | 39 | 423 | 91 |
| SPAM1-DAVD | 456 | 40 | 421 | 92 |
| SPAM1-DTDA | 454 | 41 | 419 | 93 |
| SPAM1-VKDT | 452 | 42 | 417 | 94 |
| SPAM1-ADVK | 450 | 43 | 415 | 95 |

Ejemplo 2

Expresión de mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana

5 En este ejemplo, se expresaron los mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana generados en el ejemplo 1 en células CHO-S. Adicionalmente, se expresaron rHuPH20 y PH20 etiquetada con His en cada una de las cuatro cepas de mutantes CHO resistentes a lectina, incluyendo Lec1 (n.º de cat. CRL-1735, ATCC), Lec2 (n.º de cat. CRL-1736, ATCC), Lec8 (n.º de cat. CRL-1737, ATCC) y Pro-5 (n.º de cat. CRL-1781). La expresión de PH20 en células mutantes para Lec se comenta adicionalmente en el ejemplo 9 a

A. Expresión transitoria en células CHO-S en placas de 6 pocillos

15 Se transfectaron de manera transitoria los plásmidos PH20-HZ24 mutantes generados en el ejemplo 1 en células CHO-S (derivadas de células de ovario de hámster chino CHO K1) usando GeneJuice® (Novagen) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se hicieron crecer las células CHO-S en medio CD CHO complementado con L-glutamina. Antes de la transfección, se sembraron en placa las células CHO-S en placas de 6 pocillos, con

20 aproximadamente 5×10^5 células por pocillo, y se hicieron crecer durante la noche a 37°C con el 5% de CO₂. Entonces se retiró el medio y se lavaron las células CHO-S 2 veces con 1 ml de medio libre de suero. Se mezcló GeneJuice® con medios libres de suero seguido por la adición de 2 µg de ADN de HZ24 mutante. Tras incubar a temperatura ambiente durante 5-15 minutos, se añadió gota a gota la mezcla de GeneJuice®/ADN a un pocillo individual que contenía las células CHO-S lavadas. Tras 4 horas, se reemplazó el medio por 1 ml de medio CD-CHO complementado con L-glutamina y se incubaron las células durante 72 horas a 37°C con el 5% de CO₂. Tras la

25 expresión, se recogieron los medios y las células por separado.

B. Expresión transitoria en células CHO en placas de cultivo celular de 10 cm

30 Se infectaron de manera transitoria células CHO-S con los plásmidos PH20-HZ24 mutantes generados en el ejemplo 1 usando GeneJuice® (Novagen) según las instrucciones del fabricante. Alternativamente, se infectaron de manera transitoria cuatro cepas de mutantes CHO resistentes a lectina con HZ24-PH20, (SEQ ID NO: 108, que codifica para rHuPH20), PH20sHis, (SEQ ID NO: 187, que codifica para PH20 etiquetada con His) y HZ24-mut(B/S) (SEQ ID NO: 122, que codifica para PH20 truncada en el aminoácido 482), incluyendo Lec1 (n.º de cat. CRL-1735, ATCC), Lec2 (n.º de cat. CRL-1736, ATCC), Lec8 (n.º de cat. CRL-1737, ATCC) y Pro-5 (n.º de cat. CRL-1781), usando

35 GeneJuice® (Novagen) según las instrucciones del fabricante.

En resumen, se mantuvieron células CHO-S en medio CD-CHO complementado con GlutaMax 8 mM. Se hicieron crecer células mutantes CHO resistentes a lectina en medio DMEM complementado con FBS al 10%. Antes de la transfección, se sembraron en placa las células CHO en placas de cultivo celular de 10 cm, con aproximadamente

3x10⁶ células por pocillo y se hicieron crecer durante la noche en medio DMEM complementado con FBS al 10% a 37°C con el 5% de CO₂. Entonces se retiró el medio y se lavó la monocapa de células 2 veces con 10 ml de medio libre de suero. Se mezclaron 36 µl de GeneJuice® con 1,2 ml de DMEM y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras la incubación, se añadieron 12 µg de ADN y se mezclaron suavemente. Tras incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió gota a gota la mezcla de GeneJuice®/ADN a la monocapa de células CHO y se agitó la placa de cultivo celular suavemente para permitir el mezclado. Se incubó la placa durante 4 horas a 37°C con el 5% de CO₂. Tras 4 horas, se reemplazó el medio por 12 ml de medio CD DG44 libre de detergente complementado con Glutamax-1 y se incubaron las células durante 48 horas a 37°C con el 5% de CO₂. Tras la expresión, se recogieron por separado los medios y las células.

Ejemplo 3

Solubilidad de mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana

En este ejemplo, tras la expresión transitoria, tal como se describió en el ejemplo 2 anterior, se recogieron por separado los medios y las células y se analizaron para determinar la expresión y solubilidad de PH20 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se determinó la solubilidad de los mutantes por truncamiento del extremo C-terminal examinando si la proteína expresada estaba presente en el medio de crecimiento o en las células. Los mutantes por delección del extremo C-terminal de desde 455 hasta 472 aminoácidos de longitud, correspondientes a SEQ ID NO: 55-65 y 99-101, contienen residuos de aminoácido del anclaje de GPI que sirve para unir la proteína a la membrana celular. Se trataron células que expresaban estos mutantes con fosfoinositol-fosfolipasa C (PI-PLC), que escinde el anclaje de GPI permitiendo la liberación de la proteína soluble al medio, y se determinó la presencia de PH20 en el medio resultante y las células mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

A. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Se ejecutaron muestras no reducidas en un gel de Tris-glicina al 4-20% y se transfirieron a una membrana de PVDF usando iBlot (Invitrogen). Para la inmunotransferencia de tipo Western, se usó IgG de conejo anti-PH20 (0,5 µg/ml) como anticuerpo primario y anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (0,1 ng/ml, n.º de cat. DC03L, EMD) como anticuerpo secundario. Se determinó la evidencia de expresión mediante una banda a aproximadamente 66 kDa, correspondiente a hialuronidasa PH20 humana recombinante.

B. Tratamiento con PI-PLC

1. Expresión transitoria en placas de 6 pocillos

Tras la expresión de rHuPH20 en células CHO-S durante 72 horas, tal como se describió en el ejemplo 2A anteriormente, se recogieron por separado los medios y las células. Se lavaron las células con medios libres de suero seguido por la adición de 2 ml de medios libres de suero por pocillo. Se añadió PI-PLC (0,5 unidades/pocillo) a cada pocillo y se incubaron las células en la PI-PLC durante 2 horas. Se analizaron las células y los medios resultantes mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió anteriormente.

2. Expresión transitoria en placas de cultivo tisular de 10 cm

Se prepararon dos placas cada una de células CHO-S que expresan rHuPH20, una para el tratamiento con PI-PLC y otras sin tratamiento con PI-PLC, para cada mutante del extremo C-terminal tal como se describió en el ejemplo 2B anteriormente. Tras la expresión durante 48 horas, para las células no tratadas con PI-PLC, se recogieron por separado los medios y las células. Se centrifugaron los medios recogidos, se concentraron hasta un volumen de 10 ml, y se intercambiaron el tampón a PBS usando un concentrador de MWCO de 30 kD de Amicon. Se enjuagaron las células con PBS frío y se rasparon y resuspendieron en 1,2 ml de PBS con el inhibidor de proteasas Set III (n.º de cat. 539134, Calbiochem). Se sonicaron brevemente las células resuspendidas para preparar un extracto de células completas. Para el tratamiento con PI-PLC de las células, tras la expresión durante 48 horas, se recogieron los medios no tratados, tal como se describió anteriormente. Se enjuagaron las células una vez con medio CD DG44 nuevo con Glutamax-1, y se reemplazó el medio por 12 ml de medio CD DG44 libre de detergente nuevo complementado con Glutamax-1 con 3,0 unidades de PI-PLC por placa, y se incubaron las células durante 2 horas a 37°C con el 5% de CO₂. Tras 2 horas, se recogieron por separado los medios de PI-PLC y las células, tal como se describió anteriormente. Se analizaron las células y los medios no tratados resultantes, y las células y los medios tratados con PI-PLC, mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió anteriormente.

C. Resultados

Los resultados se describen en la tabla 4 a continuación. Cuatro mutantes, ILFL (SEQ ID NO: 58), SILF (SEQ ID NO: 100), VSIL (SEQ ID NO: 59) e IVSI (SEQ ID NO: 101), presentaban baja expresión de PH20. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western muestra que los Mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana más cortos que F500 (SEQ ID NO: 59-95 y 100-101) se expresan en el medio, tal como

5 se evidencia por una banda de proteína a aproximadamente 66 kDa. Los mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana con longitudes entre L501 y A507 (SEQ ID NO: 55-58 y 99) se expresan en las células. Tras el tratamiento de estas células con PI-PLC, se libera hialuronidasa PH20 humana al medio, tal como se evidencia por una banda de proteína a aproximadamente 66 kDa. El tratamiento de células de mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana, correspondientes a SEQ ID NO: 59-65 y 100-101, con PI-PLC no tuvo ningún efecto puesto que estas proteínas se expresaban inicialmente en el medio.

| Tabla 4. Expresión de mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana. | | | | |
|---|-------------|------------------------|-----------------------|---|
| Mutante | Maduro (AA) | Expresión de proteínas | Expresado en el medio | Expresado en el medio tras la adición de PI-PLC |
| SPAM1-VASL (SEQ ID NO: 108) | 474 | SÍ | NO | SÍ |
| SPAM1-SSVA (SEQ ID NO: 55) | 472 | SÍ | NO | SÍ |
| SPAM1-IISS (SEQ ID NO: 56) | 470 | SÍ | NO | SÍ |
| SPAM1-FLII (SEQ ID NO: 57) | 468 | SÍ | NO | SÍ |
| SPAM1-LFLI (SEQ ID NO: 99) | 467 | SÍ | NO | SÍ |
| SPAM1-ILFL (SEQ ID NO: 58) | 466 | DÉBIL | NO | SÍ |
| SPAM1-SILF (SEQ ID NO: 100) | 465 | DÉBIL | DÉBIL/SÍ | Inicialmente en el medio |
| SPAM1-VSIL (SEQ ID NO: 59) | 464 | DÉBIL | SÍ | Inicialmente en el medio |
| SPAM1-IVSI (SEQ ID NO: 101) | 463 | DÉBIL | SÍ | Inicialmente en el medio |
| SPAM1-FIVS (SEQ ID NO: 60) | 462 | SÍ | SÍ | Inicialmente en el medio |
| SPAM1-TMFI (SEQ ID NO: 61) | 460 | SÍ | SÍ | Inicialmente en el medio |
| SPAM1-SATM (SEQ ID NO: 62) | 458 | SÍ | SÍ | Inicialmente en el medio |
| SPAM1-TLSA (SEQ ID NO: 63) | 456 | SÍ | SÍ | Inicialmente en el medio |
| SPAM1-STLS (SEQ ID NO: 65) | 455 | SÍ | SÍ | Inicialmente en el medio |
| SPAM1-PSTL (SEQ ID NO: 64) | 454 | SÍ | SÍ | Inicialmente en el medio |
| SPAM1-ASPS (SEQ ID NO: 66) | 452 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-YNAS (SEQ ID NO: 67) | 450 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-FYNA (SEQ ID NO: 68) | 449 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-IFYN (SEQ ID NO: 69) | 448 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-QIFY (SEQ ID NO: 70) | 447 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-PQIF (SEQ ID NO: 71) | 446 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-EPQI (SEQ ID NO: 72) | 445 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-EEPQ (SEQ ID NO: 73) | 444 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-TEEP (SEQ ID NO: 74) | 443 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-ETEE (SEQ ID NO: 75) | 442 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-METE (SEQ ID NO: 76) | 441 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-PMET (SEQ ID NO: 76) | 440 | SÍ | SÍ | n/a |

| | | | | |
|----------------------------|-----|----|----|-----|
| NO: 77) | | | | |
| SPAM1-PPME (SEQ ID NO: 78) | 439 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-KPPM (SEQ ID NO: 79) | 438 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-LKPP (SEQ ID NO: 80) | 437 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-FLKP (SEQ ID NO: 81) | 436 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-AFLK (SEQ ID NO: 82) | 435 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-DAFL (SEQ ID NO: 83) | 434 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-IDAF (SEQ ID NO: 84) | 433 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-CIDA (SEQ ID NO: 85) | 432 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-VCID (SEQ ID NO: 86) | 431 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-GVCI (SEQ ID NO: 87) | 430 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-DGVC (SEQ ID NO: 88) | 429 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-IADG (SEQ ID NO: 89) | 427 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-VCIA (SEQ ID NO: 90) | 425 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-VDVC (SEQ ID NO: 91) | 423 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-DAVD (SEQ ID NO: 92) | 421 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-DTDA (SEQ ID NO: 93) | 419 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-VKDT (SEQ ID NO: 94) | 417 | SÍ | SÍ | n/a |
| SPAM1-ADVK (SEQ ID NO: 95) | 415 | SÍ | SÍ | n/a |

Ejemplo 4

5 Solubilidad de mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana usando el ensayo de Triton® X-114

10 En este ejemplo, se sometió a prueba la solubilidad de los mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana usando un ensayo de Triton® X-114. En este ensayo, las hialuronidasas PH20 solubles se repartirán en la fase acuosa de una disolución de Triton® X-114 calentada hasta 37°C (modificación tal como se describe por Bordier *et al.*, (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7) mientras que las hialuronidasas PH20 ancladas a la membrana se repartirán en la fase rica en detergente.

15 Para este fin, se añadió Triton® X-114 al 2% (v/v) en PBS a 0°C a 200 µl de medio de cultivo tisular o extracto celular, tal como se preparó en el ejemplo 3B anterior, y se incubaron las muestras en hielo. Para la separación, se recubrió la muestra sobre una almohadilla de sacarosa de 30 µl (6% p/v) que contenía Triton® X-114 al 0,06% a 4°C en un tubo de microcentrifuga. Se calentaron las muestras hasta 37°C durante 3 minutos para inducir separación de fases y se centrifugaron durante 3 min a 4000 g a temperatura ambiente. Se retiraron las fases acuosa y de detergente para el análisis de SDS-PAGE y la inmunotransferencia de tipo Western. Se usó IgG de conejo anti-PH20 (0,5 µg/ml) como anticuerpo primario y se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (0,1 ng/ml, n.º de cat. DC03L, EMD) como anticuerpo secundario. Se usó como control PH20 humana de longitud completa, que se reparte fuertemente en la fase de detergente.

25 Los resultados de la solubilidad de los mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal se muestran en la tabla 5. Los mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana hasta F500 (precursor SEQ ID NO: 7-13 y 48-49 o maduro SEQ ID NO: 59-65 y 100-101) se reparten en la fase acuosa y son por tanto solubles. Los mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana más largos que F500 (SEQ ID NO: 55-58 y 99) se reparten en la fase de detergente y son insolubles. PH20 de longitud completa también es insoluble.

| Mutante | SEQ ID NO | Maduro (AA) | Soluble |
|------------|-----------|-------------|---------|
| SPAM1-VASL | 108 | 474 | NO |
| SPAM1-SSVA | 55 | 472 | NO |
| SPAM1-IISS | 56 | 470 | NO |
| SPAM1-FLII | 57 | 468 | NO |
| SPAM1-LFLI | 99 | 467 | NO |
| SPAM1-ILFL | 58 | 466 | NO |
| SPAM1-SILF | 100 | 465 | SÍ |
| SPAM1-VSIL | 59 | 464 | SÍ |
| SPAM1-IVSI | 101 | 463 | SÍ |
| SPAM1-FIVS | 60 | 462 | SÍ |
| SPAM1-TMFI | 61 | 460 | SÍ |
| SPAM1-SATM | 62 | 458 | SÍ |
| SPAM1-TLSA | 63 | 456 | SÍ |
| SPAM1-PSTL | 64 | 454 | SÍ |
| SPAM1-STLS | 65 | 455 | SÍ |

Ejemplo 5

5 Actividad hialuronidasa de mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana

En este ejemplo, se sometieron a prueba los mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana para determinar su actividad hialuronidasa PH20 usando un ensayo de microtitulación con ácido hialurónico biotilado (HA biotilado o bHA). Se sometieron a prueba mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana para determinar la actividad hialuronidasa tanto a pH 7,4 como a pH 5,5.

En resumen, se recubrió una placa de 96 pocillos 4xBHX con HA biotilado (1,1 MDa). Se diluyó en tampón el sobrenadante tras la transfección de 72 horas de las células transfectadas con mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana o bien a pH 7,4 o bien a pH 5,5 y se añadió a pocillos individuales de la placa y se dejó incubar a 37°C durante 90 minutos. Se terminó la reacción mediante la adición de guanidina HCl 4 M. Se lavaron las células 4x con solución salina tamponada con fosfato con Tween20 (PBST) para eliminar cualquier HA biotilado digerido seguido por la adición de estreptavidina-HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las células 4x con PBST y se reveló la placa con TMB. Se leyó la placa a 450 nm un lector de placas de ELISA. Se determinó la actividad hialuronidasa (en unidades/ml) mediante interpolación de la absorbancia medida a 450 nm con una curva patrón de referencia de hialuronidasa. Se usaron hialuronidasa PH20 humana madura de longitud completa y células CHO no transfectadas como controles positivo y negativo.

Los resultados se muestran en las tablas 6 y 6A, a continuación. Mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana más cortos que I430, correspondientes a de SPAM1-GDVC a SPAM1-ADVCK (SEQ ID NO: 88-95), son inactivos. Mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana que acaban en I498 (SEQ ID NO: 101), L499 (SEQ ID NO: 59), F500 (SEQ ID NO: 100), L501 (SEQ ID NO: 58) y I502 (SEQ ID NO: 99) tienen poca actividad detectable debido a un bajo nivel de expresión. Todos los demás mutantes por delección del extremo carboxilo-terminal de hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO: 55-57 y 60-87) son hialuronidasas activas tanto a pH 7,4 como a pH 5,5.

| Mutante por delección | Precursor (AA) | Maduro (AA) | Actividad a pH 7,4 (unidades/ml) | Actividad a pH 5,5 (unidades/ml) |
|----------------------------|----------------|-------------|----------------------------------|----------------------------------|
| SPAM1-SSVA (SEQ ID NO: 55) | 507 | 472 | 1,4715 | 1,125 |
| SPAM1-IISS (SEQ ID NO: 56) | 505 | 470 | 1,458 | 0,837 |
| SPAM1-FLII (SEQ ID NO: 57) | 503 | 468 | 0,9405 | 0,6345 |
| SPAM1-ILFL (SEQ ID NO: 58) | 501 | 466 | 0,0405 | 0,0405 |
| SPAM1-VSIL (SEQ ID NO: 59) | 499 | 464 | 0,02025 | 0,045 |
| SPAM1-FIVS (SEQ ID NO: 60) | 497 | 462 | 0,1755 | 0,216 |
| SPAM1-TMFI | 495 | 460 | 0,45 | 0,612 |

ES 2 724 588 T3

| | | | | |
|-------------------------------|-----|-----|---------|---------|
| (SEQ ID NO: 61) | | | | |
| SPAM1-SATM (SEQ ID NO: 62) | 493 | 458 | 0,5715 | 0,7335 |
| SPAM1-TLSA (SEQ ID NO: 63) | 491 | 456 | 0,3645 | 0,5625 |
| SPAM1-STLS (SEQ ID NO: 65) | 490 | 455 | 0,819 | 1,2375 |
| SPAM1-PSTL (SEQ ID NO: 64) | 489 | 454 | 1,557 | 1,089 |
| SPAM1-ASPS (SEQ ID NO: 66) | 487 | 452 | 1,017 | 0,9225 |
| SPAM1-YNAS (SEQ ID NO: 67) | 485 | 450 | 1,8765 | 1,74825 |
| SPAM1-FYNA (SEQ ID NO: 68) | 484 | 449 | 1,4985 | 1,26225 |
| SPAM1-IFYN (SEQ ID NO: 69) | 483 | 448 | 2,45025 | 2,3085 |
| SPAM1-QIFY (SEQ ID NO: 70) | 482 | 447 | 2,03175 | 1,647 |
| SPAM1-PQIF (SEQ ID NO: 71) | 481 | 446 | 1,818 | 1,701 |
| SPAM1-EPQI (SEQ ID NO: 72) | 480 | 445 | 2,1825 | 1,6425 |
| SPAM1-EEPQ (SEQ ID NO: 73) | 479 | 444 | 1,917 | 2,0745 |
| SPAM1-TEEP (SEQ ID NO: 74) | 478 | 443 | 1,764 | 1,584 |
| SPAM1-ETEE (SEQ ID NO: 75) | 477 | 442 | 2,088 | 2,0475 |
| SPAM1-METE (SEQ ID NO: 76) | 476 | 441 | 1,332 | 1,278 |
| SPAMS-PET (SEQ ID NO: 77) | 475 | 440 | 2,223 | 2,0925 |
| SPAM1-PPME (SEQ ID NO: 78) | 474 | 439 | 1,2105 | 1,341 |
| SPAM1-KPPM (SEQ ID NO: 79) | 473 | 438 | 0,8595 | 0,91575 |
| SPAM1-LKPP (SEQ ID NO: 80) | 472 | 437 | 0,5445 | 0,9 |
| SPAM1-FLKP (SEQ ID NO: 81) | 471 | 436 | 3,321 | 2,79 |
| SPAM1-AFLK (SEQ ID NO: 82) | 470 | 435 | 3,204 | 2,925 |
| SPAM1-DAFL (SEQ ID NO: 83) | 469 | 434 | 2,3895 | 2,2365 |
| SPAM1-IDAF (SEQ ID NO: 84) | 468 | 433 | 0,5625 | 0,62775 |
| SPAM1-CIDA (SEQ ID NO: 85) | 467 | 432 | 0,5535 | 0,4725 |
| SPAM1-VCID (SEQ ID NO: 86) | 466 | 431 | 0 | 0,2115 |
| SPAM1-GVCI (SEQ ID NO: 87) | 465 | 430 | 0,441 | 0,468 |
| SPAM1-DGVC (SEQ ID NO: 88) | 464 | 429 | 0 | 0,045 |
| SPAM1-IADG (SEQ ID NO: 89) | 462 | 427 | 0 | 0,00225 |
| SPAM1-VCIA (SEQ ID NO: 90) | 460 | 425 | 0 | 0,0135 |
| SPAM1-VDVC (SEQ ID NO: 91) | 458 | 423 | 0,0495 | 0,0585 |
| SPAM1-DAVD (SEQ ID NO: 92) | 456 | 421 | 0 | 0,0675 |
| SPAM1-DTDA | 454 | 419 | 0 | 0,054 |

| | | | | |
|--------------------------------|-----|-----|--------|----------|
| (SEQ ID NO: 93) | | | | |
| SPAM1-VKDT (SEQ ID NO: 94) | 452 | 417 | 0,054 | 0,0225 |
| SPAM1-ADVК (SEQ ID NO: 95) | 450 | 415 | 0,063 | 0,0405 |
| VASL (SEQ ID NO: 108) | 509 | 474 | 1,8045 | 0,891 |
| VASL + PLC (SEQ ID NO: 108) | 509 | 474 | 3,96 | 2,313 |
| HZ24-PH20 (SEQ ID NO: 109) | 482 | 447 | 0,499 | 0,726188 |
| CHO-S | n/a | n/a | 0 | 0,012375 |

| Mutante por delección | Precursor (AA) | Maduro (AA) | Actividad a pH 7,4 (unidades/ml) | Actividad a pH 5,5 (unidades/ml) |
|--------------------------------|----------------|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| SPAM1-SSVA (SEQ ID NO: 55) | 507 | 472 | 1,782 | 1,256 |
| SPAM1-IISS (SEQ ID NO: 56) | 505 | 470 | 1,863 | 0,932 |
| SPAM1-FLII (SEQ ID NO: 57) | 503 | 468 | 1,094 | 0,648 |
| SPAM1-LFLI (SEQ ID NO: 99) | 502 | 467 | 0,608 | 0,324 |
| SPAM1-ILFL (SEQ ID NO: 58) | 501 | 466 | 0,446 | 0,122 |
| SPAM1-SILF (SEQ ID NO: 100) | 500 | 465 | 0,365 | 0,162 |
| SPAM1-VSIL (SEQ ID NO: 59) | 499 | 464 | 0,486 | 0,122 |
| SPAM1-IVSI (SEQ ID NO: 101) | 498 | 463 | 0,527 | 0,203 |
| SPAM1-FIVS (SEQ ID NO: 60) | 497 | 462 | 0,365 | 0,162 |
| SPAM1-TMFI (SEQ ID NO: 61) | 495 | 460 | 0,689 | 0,770 |
| SPAM1-SATM (SEQ ID NO: 62) | 493 | 458 | 0,689 | 0,851 |
| SPAM1-TLSA (SEQ ID NO: 63) | 491 | 456 | 0,851 | 0,729 |
| SPAM1-PSTL (SEQ ID NO: 64) | 489 | 454 | 1,985 | 3,321 |
| SPAM1-ASPS (SEQ ID NO: 66) | 487 | 452 | 1,134 | 1,580 |

Ejemplo 6

5 Análisis de glicanos de rHuPH20 mediante CL-EM

En este ejemplo, se realizó un estudio de análisis de glicanos de rHuPH20 (SEQ ID NO: 122) mediante análisis espectral de masa de PH20 digerida con tripsina.

10 En resumen, se liofilizó rHuPH20 (tal como se produce en el ejemplo 15C), y se resuspendió en tampón que contenía guanidina HCl 6 M, EDTA 0,002 M y Tris 0,02 M, pH 8,28 hasta una concentración final de 0,5 mg/ml. Se añadió DTT (concentración final 10 mM) y se incubó la mezcla de proteína/DTT durante 1 hora a 37°C. Tras la reducción, se añadió yodoacetamida hasta una concentración final de 20 mM. Finalmente, se añadió tripsina (1:25 p/p) y se incubó la mezcla durante 20 horas a 37°C.

15 Se analizaron los digestos trópicos mediante CL-EM. En resumen, se inyectaron los digestos trópicos en una columna de fase inversa C18 usando las condiciones expuestas en la tabla 7 a continuación. Se recogieron datos de EM en un espectrómetro de masas Q-TOF Ultima usando ionización por electrospray (ESI) en el modo de ión positivo. Se adquirieron datos desde m/z 200-1950 en el modo de EM. Se analizaron los glicopéptidos usando el software GlycoMod (www.expasy.ch/tools/glycomod/) para determinar el tipo de glicano.

20

| Parámetro | Ajuste | | |
|-----------------------------|---|--------|--------|
| Columna | Phenomenex Synergi Hydro-RP | | |
| Temperatura de la columna | 30°C | | |
| Fase móvil A | Agua desionizada que contiene ácido fórmico al 0,2% | | |
| Fase móvil B | Acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0,2% | | |
| Gradiente | Tiempo (min) | % de A | % de B |
| | 0,0 | 97,0 | 3,0 |
| | 5,0 | 97,0 | 3,0 |
| | 144,0 | 60,0 | 40,0 |
| | 150,0 | 10,0 | 90,0 |
| | 160,0 | 10,0 | 90,0 |
| | 161,0 | 97,0 | 3,0 |
| | 180,0 | 97,0 | 3,0 |
| Velocidad de flujo | 0,2 ml/min | | |
| Volumen de inyección | 5 µl | | |
| Tiempo de ejecución (total) | 180 minutos | | |

La hialuronidasa PH20 humana tiene un sitio de O-glicosilación en T475. El sitio está ocupado por un glicano de tipo 1 de núcleo que tiene dos ácidos siálicos. rHuPH20 está glicosilada en seis residuos de asparagina diferentes, incluyendo N82, N166, N235, N254, N368 y N393. Los resultados muestran que N254 está ocupado aproximadamente al 75%, N393 está ocupado aproximadamente al 85%, y los cuatro sitios restantes, N82, N166, N235 y N368, están ocupados a más del 99%. Los tres tipos de N-glicanos, los tipos de alto contenido en manosa, híbridos y complejos, están presentes en rHuPH20. En general, rHuPH20 contiene aproximadamente el 45% de glicanos con alto contenido en manosa, el 45% de glicanos complejos y el 10% de glicanos híbridos. Aproximadamente el 35% de los glicanos totales son aniónicos, de los cuales el 25% contienen un ácido siálico y el 10% restante contienen un grupo aniónico desconocido, posiblemente un grupo fosfato. La mayoría de los glicanos complejos están fucosilados y los glicanos complejos aniónicos contienen mayoritariamente un ácido siálico mientras que unos cuantos de ellos contienen dos ácidos siálicos. Cada residuo de asparagina tiene aproximadamente el 90% de un tipo de glicano y una pequeña proporción de los otros dos tipos de glicanos, con la excepción de N235. El tipo de glicano principal para cada residuo se expone en la tabla 8 a continuación. Los residuos N82, N166 y N254 están ocupados por glicanos complejos. Los residuos N368 y N393 están ocupados por glicanos con alto contenido en manosa. El residuo N235 está ocupado aproximadamente al 80% de glicanos con alto contenido en manosa, con aproximadamente el 20% de glicanos complejos.

| Sitio de glicano | Glicanos con alto contenido en manosa | Glicanos complejos |
|------------------|---------------------------------------|--------------------|
| N82 | | X |
| N166 | | X |
| N235 | ~80% | ~20% |
| N254 | | X |
| N368 | X | |
| N393 | X | |

20 Ejemplo 7

Desglicosilación de hialuronidasa PH20 humana mediante tratamiento con endoglicosidasas

En este ejemplo, se desglicosiló hialuronidasa PH20 humana mediante tratamiento de rHuPH20 purificada (SEQ ID NO: 122) con diversas glicosidasas y se evaluó la actividad hialuronidasa. La hialuronidasa PH20 humana está glicosilada en seis residuos de asparagina diferentes, incluyendo N82, N166, N235, N254, N368 y N393. Se usaron cinco glicosidasas para generar PH20 humana hialuronidasa desglicosilada, incluyendo: PNGasaF (New England Biolabs, n.º de cat. P0704S, lote n.º 34), que escinde todos los N-glicanos; EndoF1, que escinde glicanos con alto contenido en manosa y de tipo híbrido; EndoF2, que escinde glicanos de tipo complejo biantenarios; EndoF3, que escinde glicanos complejos biantenarios y más ramificados; y EndoH (New England Biolabs, n.º de cat. P0702S), que escinde glicanos con alto contenido en manosa y de tipo híbrido. Por tanto, el tratamiento con PNGasaF da como resultado una desglicosilación completa mientras que el tratamiento con endoglicosidasas da como resultado sólo desglicosilación parcial.

35 Para lograr una desglicosilación completa, se incubó rHuPH20 purificada (concentración final de 0,1 mg/ml) con PNGasaF (50.000 unidades/ml) en tampón fosfato 50 mM pH 7,2 durante la noche a 37°C. Para lograr una desglicosilación parcial, se incubó rHuPH20 purificada (concentración final de 0,5 mg/ml) con 0,3 unidades/ml de endoglicosidasa (o bien EndoF1, EndoF2, EndoF3 o bien EndoH) o una mezcla de las cuatro endoglicosidasas en tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,0 durante la noche a 35°C. Se analizó la desglicosilación de rHuPH20

mediante el cambio en la movilidad de PH20 mediante SDS-PAGE. Se determinó la actividad enzimática hialuronidasa tal como se describe en el ejemplo 5.

5 La hialuronidasa PH20 humana tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kDa. El tratamiento con EndoF1, EndoH o una mezcla de EndoF1, EndoF2, EndoF3 y EndoH dio como resultado hialuronidasa PH20 humana parcialmente desglicosilada tal como se determinó mediante el cambio en la movilidad por SDS-PAGE hasta un peso molecular de aproximadamente 56 kDa. El Tratamiento con PNGasaF dio como resultado desglicosilación completa de hialuronidasa PH20 humana. La desglicosilación parcial de rHuPH20 no dio como resultado la inactivación de la actividad enzimática hialuronidasa mientras que una digestión exhaustiva con PNGasaF hasta
10 eliminar completamente los N-glicanos dio como resultado la pérdida total de la actividad enzimática hialuronidasa (véase la tabla 9 a continuación).

| rHuPH20 (U/ml) | PH20 de control | EndoF1 | EndoF2 | EndoF3 | EndoH | EndoF1, F2, F3, H | PNGasaF |
|----------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|-------------------|---------|
| 1,0000 | 0,3195 | 0,2983 | 0,2573 | | 0,2965 | 0,2144 | 1,9315 |
| 0,2000 | 0,7910 | 0,7656 | 0,6048 | 0,5880 | 0,7435 | 0,5366 | 1,9173 |
| 0,0400 | 1,4299 | 1,3450 | 1,3117 | 1,2255 | 1,3584 | 1,3877 | 1,9926 |
| 0,0080 | 1,8397 | 1,7338 | 1,6900 | 1,6698 | 1,6998 | 1,8418 | 1,9172 |

Ejemplo 8

15 Tratamiento de hialuronidasa PH20 humana con inhibidores de la glicosilación

En este ejemplo, se expresó de manera transitoria rHuPH20 (SEQ ID NO: 122) en presencia de cada uno de dos inhibidores de la glicosilación y se evaluaron la secreción y la actividad hialuronidasa. La kifunensina es un potente inhibidor de manosidasa I, una enzima implicada en el procesamiento de glicanos (véase, por ejemplo, Elbein *et al.*, J Biol Chem, 265:15599-15605 (1990)). La tunicamicina es una mezcla de antibióticos nucleósidos homólogos que inhiben la enzima GlcNAc fosfo-transferasa (GPT), bloqueando de ese modo la síntesis de todos los N-glicanos (véase, por ejemplo, Böhme *et al.*, Eur. J. Biochem. 269:977-988 (2002)).

25 En resumen, se sembraron 1×10^6 células HZ24-2B2 que expresaban rHuPH20 (véase el ejemplo 14 más adelante) en 24 ml de medio CD-CHO completo en dos frascos de 125 ml. Se añadió tunicamicina (disuelta en DMSO) o kifunensina (recién disuelta en agua) hasta una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$ (que contenía 12 μl de DMSO). Como control, se sembró un frasco con 1×10^6 células HZ24-2B2 que expresaban rHuPH20 y se añadieron 12 μl de DMSO como control de vehículo. Tras la adición de o bien tunicamicina o bien kifunensina, se incubaron las células durante
30 4-6 horas a 37°C con el 5% de CO₂. Tras la expresión, se retiraron 2 ml de cultivo y se centrifugaron durante 5 minutos a 500 g. Se almacenó el sobrenadante a 4°C y se almacenaron los sedimentos celulares a -20°C. Se centrifugaron los 22 ml de cultivos restantes durante 5 minutos a 500 g. Se almacenó el sobrenadante a 4°C. Se resuspendieron las células en 22 ml de medio CD-CHO completo en los dos frascos de 125 ml originales. Se añadió tunicamicina o kifunensina al cultivo a una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron las células a 37°C con el
35 5% de CO₂. Se retiraron dos ml (2 ml) de los cultivos de cada frasco a aproximadamente cada 24 horas tras el cambio de medio. Para cada punto de tiempo, se almacenó el sobrenadante a 4°C y se almacenaron los sedimentos celulares a -20°C. Se analizó la expresión de rHuPH20 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western y se midió la actividad hialuronidasa usando el ensayo enzimático de HA biotinilado (tal como se describió en los ejemplos 3 y 5 anteriormente).

40 Los resultados se muestran en las tablas 10-13 a continuación, que exponen el número de células viables y la actividad de PH20. Tal como se muestra en las tablas 10-11, la tunicamicina inhibe la actividad de PH20 tanto en medio de cultivo tisular como dentro de la célula y también da como resultado una pérdida completa de viabilidad celular. Adicionalmente, una hora de tratamiento con tunicamicina dio como resultado la acumulación de hialuronidasa PH20 humana desglicosilada dentro de la célula, tal como se determinó mediante el cambio de
45 movilidad en SDS-PAGE hasta un peso molecular de aproximadamente 56 kDa en las fracciones de sedimento celular. Tal como se muestra en las tablas 12-13, la kifunensina no afectó a la actividad de PH20 mientras que el análisis de inmunotransferencia de tipo Western reveló que la kifunensina inhibía la expresión y secreción de rHuPH20 en células tratadas.

50

| Tiempo (horas) | Con tunicamicina | | Sin tunicamicina | |
|----------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| | Células viables ($\times 10^6$) | Actividad de PH20 (U/ml) | Células viables ($\times 10^6$) | Actividad de PH20 (U/ml) |
| 0 | 1,04 | 0,50 | 1,04 | 0,00 |
| 1 | 1,04 | 2,80 | 1,04 | 1,50 |
| 2 | 1,04 | 5,00 | 1,04 | 3,00 |

| | | | | |
|----|-------|------|------|--------|
| 4 | 0,910 | 8,80 | 1,30 | 7,00 |
| 25 | 1,08 | 5,80 | 1,32 | 82,50 |
| 49 | 0,200 | 6,80 | 2,72 | 171,30 |
| 73 | 0,080 | 7,80 | 3,80 | 331,00 |
| 91 | 0 | 7,50 | 6,25 | 313,30 |

Tabla 11. Efecto de tunicamicina sobre la viabilidad celular y la actividad de PH20 en sedimentos celulares

| Tiempo (horas) | Con tunicamicina | | Sin tunicamicina | |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| | Células viables (x10 ⁶) | Actividad de PH20 (U/ml) | Células viables (x10 ⁶) | Actividad de PH20 (U/ml) |
| 0 | 1,04 | 34,50 | 1,04 | 35,00 |
| 1 | 1,04 | 38,00 | 1,04 | 38,10 |
| 2 | 1,04 | 34,00 | 1,04 | 36,60 |
| 4 | 0,910 | 18,00 | 1,30 | 31,90 |
| 25 | 1,08 | 1,00 | 1,32 | 14,40 |
| 49 | 0,200 | 0,80 | 2,72 | 33,10 |
| 73 | 0,080 | 0,30 | 3,80 | 67,50 |
| 91 | 0 | 0,30 | 6,25 | 79,40 |

Tabla 12. Efecto de kifunensina sobre la viabilidad celular y la actividad de PH20 en medio de cultivo tisular

| Tiempo (horas) | Con kifunensina | | Sin kifunensina | |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| | Células viables (x10 ⁶) | Actividad de PH20 (U/ml) | Células viables (x10 ⁶) | Actividad de PH20 (U/ml) |
| 0 | 1 | 0,4 | 1 | 0,45 |
| 6 | 1 | 23,85 | 1 | 15,75 |
| 24 | 1,2 | 129,6 | 1,4 | 75,6 |
| 50 | 2,1 | 299,7 | 2,4 | 206,55 |
| 72 | 3 | 535,95 | 4,4 | 444,15 |
| 96 | 3,7 | 945 | 6,3 | 726,3 |
| 144 | 5,8 | 2968,65 | 8,5 | 2241 |

Tabla 13. Efecto de kifunensina sobre la viabilidad celular y la actividad de PH20 en sedimentos celulares

| Tiempo (horas) | Con kifunensina | | Sin kifunensina | |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| | Células viables (x10 ⁶) | Actividad de PH20 (U/ml) | Células viables (x10 ⁶) | Actividad de PH20 (U/ml) |
| 0 | 1 | 22,25 | 1 | 23 |
| 6 | 1 | 21,25 | 1 | 27 |
| 24 | 1,2 | 27,75 | 1,4 | 14,45 |
| 50 | 2,1 | 43 | 2,4 | 26 |
| 72 | 3 | 98,75 | 4,4 | 52,75 |
| 96 | 3,7 | 208,75 | 6,3 | 167,5 |
| 144 | 5,8 | 497,25 | 8,5 | 107 |

5 Ejemplo 9

Expresión transitoria de rHuPH20 en mutantes CHO resistentes a lectina

10 En este ejemplo, se expresó de manera transitoria rHuPH20 en cuatro mutantes CHO resistentes a lectina y se evaluaron la secreción y actividad hialuronidasa. Los mutantes CHO resistentes a lectina se resumen en la tabla 14 a continuación. Las células Pro5 carecen de la galactosiltransferasa β 4galT-6 lo que provoca una reducción en los N-glicanos galactosilados (véase, por ejemplo, Lee *et al.* J. Biol. Chem. 276:13924-13934 (2001)). Las células Lec1 carecen de actividad N-acetilglucosaminiltransferasa I y por tanto no sintetizan glicanos híbridos o complejos (véase, por ejemplo, Chen y Stanley, Glycobiology, 13:43-50 (2003)). Lec2 y Lec8 son deficientes en transportadores de azúcares de nucleótidos, que transportan azúcares de nucleótidos a través del RE o la membrana de Golgi. Las células Lec2 no pueden translocar ácido CMP-sialico (concretamente CMP-NeuAc) provocando por tanto la expresión de superficies celulares asialo (véase, por ejemplo, Eckhardt *et al.*, J. Biol. Chem. 273:20189-20195 (1998)). Las células Lec8 no pueden translocar UDP-galactosa, provocando por tanto que los glicanos carezcan de galactosa (véase, por ejemplo, Bakker *et al.*, Glycobiology, 15:193-201 (2005)).

20

| Tabla 14. Mutantes CHO resistentes a lectina | | |
|--|---------------------|---------------------------------|
| Línea CHO | Cambio bioquímico | Cambio genético |
| Pro5 (original) | ↓ Gal en N-glicanos | Sin expresión de β 4galT6 |

| | | |
|------|---|--|
| Lec1 | ↓ GlcNAc-TI | Inserción/delección en ORF de <i>Mgat1</i> |
| Lec2 | ↓ transportador de Golgi de ácido CMP-sialico | Mutación en ORF de <i>Slc35a1</i> |
| Lec8 | ↓ transportador de Golgi de UDP-Gal | Mutación en ORF de <i>Slc35a2</i> |

En resumen, se expresó de manera transitoria PH20sHis (que codifica para PH20 etiquetada con His, SEQ ID NO: 187) en cada una de las cuatro cepas de mutantes CHO resistentes a lectina, incluyendo Lec1 (n.º de cat. CRL-1735, ATCC), Lec2 (n.º de cat. CRL-1736, ATCC), Lec8 (n.º de cat. CRL-1737, ATCC) y Pro-5 (n.º de cat. CRL-1781) tal como se describió en el ejemplo 2A anteriormente. Adicionalmente, se expresó de manera transitoria HZ24-mut(B/S) (que codifica para PH20 truncada en el aminoácido 482, SEQ ID NO: 122) en células Pro⁵ y, como control negativo, se sometieron células Pro⁵ a una transfección simulada. Se analizó el medio de cultivo celular resultante mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western y se midió la actividad hialuronidasa usando el ensayo enzimático de HA biotinilado (tal como se describió en los ejemplos 3 y 5 anteriormente).

Los resultados muestran que rHuPH20 expresada en los mutantes Lec se secreta al medio, tal como se evidencia por una banda de proteína a aproximadamente 66 kDa. Los resultados del ensayo enzimático de bHA se exponen en la tabla 15 a continuación, que expone el mutante CHO resistente a lectina, el plásmido que codifica para PH20 usado para transfectar las células y la actividad de PH20 a pH 5,5 para una dilución tanto de 1:27 como de 1:81. rHuPH20 expresada por células mutantes para Lec es enzimáticamente activa.

| Mutante para lectina | Pro-5 | Pro-5 | Lec1 | Lec2 | Lec8 | Pro-5 |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|
| Plásmido | HZ24-mut(B/S) | HZ24-PH20sHis | HZ24-PH20sHis | HZ24-PH20sHis | HZ24-PH20sHis | Transfección simulada |
| Actividad de PH20 (1:27) | 0,6615 | 0,297 | 0,54 | 0,675 | 0,2565 | 0,081 |
| Actividad de PH20 (1:81) | 1,1745 | 0,6075 | 0,7695 | 1,053 | 0,567 | 0,1215 |

Ejemplo 10

Mutagénesis dirigida al sitio de sitios de N-glicosilación de hialuronidasa PH20 humana

En este ejemplo, se generaron mutantes por desglucosilación de hialuronidasa PH20 humana específica de sitios de N-glicano y se evaluaron sus patrones de secreción y la actividad enzimática hialuronasa. Los tipos de mutantes por desglucosilación específica de sitios de N-glicano y los tipos de glicano se exponen en la tabla 16 a continuación.

Se usó PH20sHis (SEQ ID NO: 210) como molde para la mutagénesis de cada residuo de asparagina a alanina usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange® (n.º de cat. 200518, Stratagene). La proteína codificada por el ADN de molde corresponde a PH20sHis (SEQ ID NO: 187), un clon de PH20 humana que contiene una etiqueta de HexaHis (SEQ ID NO: 142) tras el aminoácido S490. PH20sHis de tipo natural y mutantes desglucosilados se exponen en la tabla 16. Se generaron seis mutantes individuales, uno para cada uno de los sitios de N-glicosilación. Adicionalmente, se generaron tres mutantes dobles y un mutante triple para las asparaginas N82, N166 y N254, las cuales están ocupadas por glicanos de tipo complejo. Finalmente, se generó un mutante doble N368A/N393A, que carecía de glicanos con alto contenido en manosa. Se transfectaron los mutantes en células CHO-S y se realizó la expresión tal como se describió en el ejemplo 2A. Se determinaron la secreción al medio y la actividad hialuronidasa tal como se describió en los ejemplos 3 y 5, anteriormente.

Los resultados se muestran en la tabla 16 a continuación, que expone la mutación, los tipos de glicano, si la proteína se secretaba al medio y la actividad hialuronidasa tanto a pH 5,5 como a pH 7,4. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western mostró que la mutación de los residuos N82, N166, N235 y N254 no tenía ningún efecto sobre la secreción de la proteína rHuPH20 al medio. Alternativamente, la mutación de los residuos N368A y N368A/N393A impidió la expresión y secreción de PH20, tal como se evidencia por la falta de proteína a aproximadamente 66 kDa en el medio. La mutación del residuo N393A dio como resultado una expresión de proteína reducida, pero se observó rHuPH20 en el medio, tal como se evidencia por una banda de proteína a aproximadamente 66 kDa. La mutación de los residuos N82, N166 y/o N254 no tuvo ningún efecto sobre la actividad de rHuPH20. Estos residuos están ocupados por glicanos complejos. En cambio, la mutación de los residuos N235, N368 y/o N393, que contienen glicanos con alto contenido en manosa, dio como resultado una pérdida completa de actividad detectable en el medio debido a una falta de secreción.

| Mutante | SEQ ID NO | Tipo de glicano | Secreción | Actividad a pH 5,5 | Actividad a pH 7,4 |
|---------------------|-----------|-----------------|-----------|--------------------|--------------------|
| PH20sHis (original) | 187 | Ambos | SÍ | SÍ | SÍ |

| | | | | | |
|------------------|-----|--|---------------|----|----|
| N82A | 202 | Complejo | SÍ | SÍ | SÍ |
| N166A | 203 | Complejo | SÍ | SÍ | SÍ |
| N235A | 204 | Con alto contenido en manosa (80%) Complejo (20%) | SÍ | NO | NO |
| N254A | 205 | Complejo | SÍ | SÍ | SÍ |
| N368A | 188 | Con alto contenido en manosa | NO | NO | NO |
| N393A | 189 | Con alto contenido en manosa | SÍ (DÉBIL) | NO | NO |
| N82A/N166A | 206 | Complejo | SÍ | SÍ | SÍ |
| N82A/N254A | 207 | Complejo | SÍ | SÍ | SÍ |
| N166A/N254A | 208 | Complejo | SÍ | SÍ | SÍ |
| N82A/N166A/N254A | 209 | Complejo | SÍ | SÍ | SÍ |
| N368A/N393A | 190 | Con alto contenido en manosa | NO | NO | NO |

Se usó análisis de inmunofluorescencia de células CHO con un anticuerpo anti-PH20 para visualizar la expresión de los mutantes por desglicosilación específica de sitios de N-glicano N368A, N393A y N368A/N393A. Se sembraron las células CHO para cultivo en monocapa sobre portaobjetos con cámara de 8 pocillos con 200 μ l de células a $2,5 \times 10^4$ células por ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS) y se hicieron crecer a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂. Se transfectaron las células 36 horas más tarde al 80% de confluencia usando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) tal como sigue. Se mezclaron suavemente ADN (0,4 μ g en 50 μ l de DMEM sin suero) y Lipofectamine™ 2000 (1 μ l en DMEM sin suero) durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se añadieron a cada pocillo que contenía células y 100 μ l de medio libre de suero. Se efectuó el mezclado moviendo suavemente la placa hacia atrás y hacia delante. Entonces se incubaron las células a 37°C en un incubador de CO₂ durante 4-6 horas tras lo cual se reemplazó el medio por medio que contenía FBS al 10%. A las 48 horas tras la transfección, se fijaron las células en los portaobjetos con cámara con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Se lavaron las células 3x con PBS y se añadieron 200 μ l de una disolución de NP-40/PBS al 1% y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células 3x con PBS y se almacenaron a 4°C antes del inmunomarcaje.

Para inmunomarcar las células, se bloquearon las muestras con suero de cabra normal al 15% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron las células con una disolución 1:20 de IgG de conejo anti-PH20 diluida en suero de cabra normal al 5% en PBS durante 2 horas. Finalmente, se lavaron las células 3x con PBS seguido por incubación con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con FITC durante 1 hora seguido por visualización. Además, la disolución de montaje contenía DAPI que permitía la tinción de los núcleos. El análisis de inmunofluorescencia usando el anticuerpo anti-PH20 mostró que las mutaciones N368A y N393A provocaban la acumulación de PH20 dentro de las células.

Resumen de estudios de N-glicosilación

Tal como se presentó en los ejemplos 7-10 anteriormente, la glicosilación con unión a N es esencial para el plegamiento y la actividad enzimática apropiados de rHuPH20. La desglicosilación completa de rHuPH20, efectuada mediante una digestión exhaustiva con PNGasaF o mediante inhibición de la glicosilación durante la biosíntesis mediante tratamiento con tunicamicina, suprimió toda la actividad enzimática detectable. Además, se mostró que rHuPH20 no glicosilada se acumulaba en la célula. En cambio, rHuPH20 parcialmente desglicosilada, efectuada mediante tratamiento con kifunensina o mediante expresión en mutantes Lec, conservaba la actividad enzimática. Finalmente, el análisis mutacional detallado usando mutagénesis dirigida al sitio reveló que la presencia de glicanos de tipo de alto contenido en manosa es necesaria para la producción de rHuPH20 soluble, enzimáticamente activa.

Ejemplo 11

Generación de una línea celular que expresa rHuPH20 soluble

Se usó el plásmido HZ24 (expuesto en SEQ ID NO: 140) para transfectar células de ovario de hámster chino (células CHO) (véanse por ejemplo las solicitudes de patente estadounidense n.ºs 10.795.095, 11/065.716 y 11/238.171). El vector de plásmido HZ24 para la expresión de rHuPH20 soluble contiene una estructura principal de vector pCI (Promega), ADN que codifica para los aminoácidos 1-482 de hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO: 110), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón. La estructura principal de vector pCI incluye ADN que codifica para el gen de resistencia a Beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación f1, una región potenciadora/promotora temprana inmediata de citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico, y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica para el constructo de rHuPH20 soluble contiene un sitio NheI y una secuencia consenso Kozak antes del ADN que codifica para la metionina en la posición de aminoácido 1 de la secuencia de señal de 35 aminoácidos

nativa de PH20 humana, y un codón de terminación tras el ADN que codifica para la tirosina correspondiente a la posición de aminoácido 482 de la hialuronidasa PH20 humana expuesta en SEQ ID NO: 107, seguido por un sitio de restricción BamHI. El constructo pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por tanto, da como resultado una única especie de ARNm dirigida por el promotor de CMV que codifica para los aminoácidos 1-482 de PH20 humana (expuesta en SEQ ID NO: 109 y los aminoácidos 1-186 de dihidrofolato reductasa de ratón (expuesta en SEQ ID NO: 141), separado por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

Se sembraron células DG44 CHO no transfectadas en medio CD-CHO modificado de GIBCO para células DHFR(-), complementado con glutamina 4 mM y Plurionic F68/L 18 ml/l (Gibco), a $0,5 \times 10^6$ células/ml en un frasco agitador en la preparación para la transfección. Se hicieron crecer las células a 37°C en el 5% de CO₂ en un incubador humidificado, agitando a 120 rpm. Se sometieron a prueba células DG44 CHO no transfectadas que crecían exponencialmente antes de la transfección.

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

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

Dos días tras la electroporación, se retiraron 0,5 ml de medio de cultivo tisular de cada pocillo y se sometió a prueba para detectar la presencia de actividad hialuronidasa, usando el ensayo de microturbidez descrito en el ejemplo 12. Los resultados se muestran en la tabla 17.

| | Dilución | Actividad unidades/ml |
|----------------------|-----------|-----------------------|
| Transfección 1 330 V | De 1 a 10 | 0,25 |
| Transfección 2 350 V | De 1 a 10 | 0,52 |
| Control negativo | De 1 a 10 | 0,015 |

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

Se identificaron diez clones de las 5 placas hechos crecer sin metotrexato (tabla 18).

| Placa/ID de pocillo | Hialuronidasa relativa |
|---------------------|------------------------|
| 1C3 | 261 |
| 2C2 | 261 |
| 3D3 | 261 |
| 3E5 | 243 |
| 3C6 | 174 |
| 2G8 | 103 |
| 1B9 | 304 |
| 2D9 | 273 |
| 4D10 | 302 |

Se expandieron seis clones de HZ24 en cultivo y se transfirieron a frascos agitadores como suspensiones de células individuales. Se sembraron en placa los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 y 4D10 en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos usando una estrategia de dilución infinita bidimensional en la que se diluyeron células 1:2 hacia abajo de la placa, y 1:3 a lo largo de la placa, comenzando a 5000 células en el pocillo en la parte superior izquierda. Se hicieron crecer los clones diluidos en un fondo de 500 células DG44 CHO no transfectadas por pocillo, para proporcionar factores de crecimiento necesarios para los días iniciales en cultivo. Se prepararon diez placas por subclón, conteniendo 5 placas metotrexato 50 nM y 5 placas sin metotrexato.

El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales (13 del tratamiento sin metotrexato, y 11 del tratamiento con metotrexato 50 nM. Se midió la actividad hialuronidasa significativa en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (>50 unidades/ml), y se expandieron estos 8 subclones en frascos de cultivo tisular T-25. Se expandieron clones aislados del tratamiento con metotrexato en presencia de metotrexato 50 nM. Se expandió adicionalmente el clon 3D35M en metotrexato 500 nM dando lugar a clones que producían en exceso de 1.000 unidades/ml en frascos agitadores (clon 3D35M; o 3D35M Gen1). Entonces se preparó un banco de células maestras (MCB) de las células 3D35M.

Ejemplo 12

Determinación de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble

Se determinó la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble en muestras tales como cultivos celulares, fracciones de purificación y disoluciones purificadas usando un ensayo turbidimétrico, que se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con albúmina sérica. Se mide la actividad incubando rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo fijo (10 minutos) y luego precipitando el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina sérica acidificada. Se mide la turbidez de la muestra resultante a 640 nm tras un periodo de revelado de 30 minutos. La disminución en la turbidez resultante de la actividad enzimática sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble. El método se realiza usando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de trabajo de rHuPH20 soluble, y se realizan mediciones de la actividad de la muestra en relación con esta curva de calibración.

Se prepararon diluciones de la muestra en disolución de diluyente enzimático. Se preparó la disolución de diluyente enzimático disolviendo $33,0 \pm 0,05$ mg de gelatina hidrolizada en 25,0 ml del tampón de reacción PIPES 50 mM (NaCl 140 mM, PIPES 50 mM, pH 5,5) y 25,0 ml de SWFI, y diluyendo 0,2 ml de disolución de buminato al 25% en la mezcla y agitando con vórtex durante 30 segundos. Se realiza esto en el plazo de 2 horas del uso y se almacenó en hielo hasta que se necesitara. Se diluyeron las muestras hasta una estimación de 1-2 U/ml. Generalmente, la dilución máxima por etapa no superó 1:100 y el tamaño de muestra inicial para la primera dilución no era inferior a 20 μ l. Los volúmenes de muestra mínimos para realizar el ensayo fueron: muestras en proceso, fracciones de FPLC: 80 μ l; sobrenadantes de cultivo tisular: 1 μ l; material concentrado 80 μ l; material de etapa final o purificado: 80 μ l. Se prepararon las diluciones por triplicado en una placa de 96 pocillos de baja unión de proteína, y se transfirieron 30 μ l de cada dilución a placas de fondo negro/transparente Optilux (BD BioSciences).

Se prepararon diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2,5 U/ml en disolución de diluyente enzimático para generar una curva patrón y se añadió a la placa Optilux por triplicado. Las diluciones incluían 0 U/ml, 0,25 U/ml, 0,5 U/ml, 1,0 U/ml, 1,5 U/ml, 2,0 U/ml y 2,5 U/ml. Se incluyeron pocillos de "blanco reactivo" que contenían 60 μ l de disolución de diluyente enzimático en la placa como control negativo. Entonces se cubrió la placa y se calentó en un bloque térmico durante 5 minutos a 37°C. Se retiró la cubierta y se agitó la placa durante 10 segundos. Tras agitar, se devolvió la placa al bloque térmico y se cebó el dispositivo de manipulación de líquidos MULTIDROP 384 con la disolución de hialuronato de sodio 0,25 mg/ml caliente (preparada disolviendo 100 mg de hialuronato de sodio (LifeCore Biomedical) en 20,0 ml de SWFI. Se mezcló esto girando y/o moviendo suavemente a 2-8°C durante 2-4 horas, o hasta la disolución completa). Se transfirió la placa de reacción al MULTIDROP 384 y se inició la reacción pulsando la clave de inicio para dispensar 30 μ l de hialuronato de sodio en cada pocillo. Entonces se retiró la placa del MULTIDROP 384 y se agitó durante 10 segundos antes de transferirse a un bloque térmico con la cubierta de placa colocada de nuevo. Se incubó la placa a 37°C durante 10 minutos

Se preparó el MULTIDROP 384 para detener la reacción cebando la máquina con disolución de trabajo de suero y cambiando el ajuste de volumen a 240 μ l. (25 ml de disolución madre de suero [se diluyó 1 volumen de suero de caballo (Sigma) con 9 volúmenes de disolución tampón de acetato 500 mM y se ajustó el pH a 3,1 con ácido clorhídrico] en 75 ml de disolución tampón de acetato 500 mM). Se retiró la placa del bloque térmico y se colocó sobre el MULTIDROP 384 y se dispensaron 240 μ l de disoluciones de trabajo de suero en los pocillos. Se retiró la placa y se agitó en un lector de placas durante 10 segundos. Tras 15 minutos adicionales, se midió la turbidez de las muestras a 640 nm y se determinó la actividad hialuronidasa (en U/ml) de cada muestra mediante ajuste a la curva patrón.

Se calculó la actividad específica (unidades/mg) dividiendo la actividad hialuronidasa (U/ml) entre la concentración de proteína (mg/ml).

Ejemplo 13

Producción y purificación de sPH20 humana Gen1

A. Procedimiento en biorreactor de 5 l

Se descongeló un vial de 3D35M y se expandió a partir de frascos agitadores a través de frascos fagadores de 1 l en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) complementado con metotrexato 100 nM y GlutaMAX™-1 (Invitrogen). Se transfirieron las células desde frascos centrifugadores hasta un biorreactor de 5 l (Braun) a una densidad de inoculación de 4×10^5 células viables por ml. Los parámetros fueron punto de ajuste de temperatura de 37°C, pH 7,2 (punto de ajuste inicial), con un punto de ajuste de oxígeno disuelto del 25% y un recubrimiento de aire de 0-100 cc/min. A las 168 h, se añadieron 250 ml de medio de alimentación n.º 1 (CD CHO con glucosa 50 g/l). A las 216 horas, se añadieron 250 ml de medio de alimentación n.º 2 (CD CHO con glucosa 50 g/l y butirato de sodio 10 mM), y a las 264 horas se añadieron 250 ml de medio de alimentación n.º 2. Este procedimiento dio como resultado una productividad final de 1600 unidades por ml con una densidad celular máxima de 6×10^6 células/ml. La adición de butirato de sodio era para potenciar drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en las fases de producción finales.

Se clarificó el medio condicionado del clon 3D35M mediante filtración profunda y diafiltración de flujo tangencial en Hepes 10 mM pH 7,0. Entonces se purificó rHuPH20 soluble mediante cromatografía secuencial en intercambio iónico de Q Sepharose (Pharmacia), cromatografía de interacción hidrófoba de Phenyl Sepharose (Pharmacia), boronato de fenilo (Prometics) y cromatografía de hidroxiapatita (Biorad, Richmond, CA).

rHuPH20 soluble se unió a Q Sepharose y se eluyó a NaCl 400 mM en el mismo tampón. Se diluyó el eluato con sulfato de amonio 2 M hasta una concentración final de sulfato de amonio 500 mM y se hizo pasar a través de una columna de Phenyl Sepharose (Low Sub), seguido por unión en las mismas condiciones a una resina de boronato de fenilo. Se eluyó la rHuPH20 soluble de la resina de Phenyl Sepharose en Hepes pH 6,9 tras lavar a pH 9,0 en bicina 50 mM sin sulfato de amonio. Se cargó el eluato sobre una resina de hidroxiapatita cerámica a pH 6,9 en fosfato de potasio 5 mM y CaCl₂ 1 mM y se eluyó con fosfato de potasio 80 mM, pH 7,4 con CaCl₂ 0,1 mM.

La rHuPH20 soluble purificada resultante presentaba una actividad específica en exceso de 65.000 unidades USP/mg de proteína por medio del ensayo de microturbidez (ejemplo 12) usando el patrón de referencia de la USP. sPH20 purificada se eluyó como un único pico desde 24 hasta 26 minutos a partir de una columna de estireno-divinilbenceno 5RPC de Pharmacia con un gradiente entre TFA al 0,1%/H₂O y TFA al 0,1%/90% de acetonitrilo/10% de H₂O y se resolvió como una única banda de 61 kDa ancha mediante electroforesis en SDS que se redujo hasta una banda de 51 kDa estrecha tras el tratamiento con PNGASE-F. La secuenciación de aminoácidos N-terminales reveló que el péptido líder se había eliminado eficazmente.

B. Procedimiento de expansión de cultivo celular anterior al cultivo celular en biorreactor de 100 l

Se usó un procedimiento de aumento de escala para purificar por separado rHuPH20 soluble de cuatro viales diferentes de células 3D35M para producir 4 lotes separados de sHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C. Cada vial se expandió por separado y se cultivó a través de un biorreactor de 125 l, luego se purificó usando cromatografía en columna. Se tomaron muestras a lo largo de todo el procedimiento para evaluar parámetros tales como rendimiento enzimático. La descripción del procedimiento proporcionada a continuación expone especificaciones representativas para cosas tales como volúmenes de medios de alimentación e iniciación del biorreactor, densidades celulares de transferencia y volúmenes de elución y lavado. Los numerosos exactos varían ligeramente con cada lote, y se detallan en las tablas 24 a 30.

Se descongelaron cuatro viales de células 3D35M en un baño de agua de 37°C, se añadió CD CHO que contenía metotrexato 100 nM y GlutaMAX 40 ml/l y se centrifugaron las células. Se resuspendieron las células en un frasco de agitación de 125 ml con 20 ml de medio nuevo y se colocó en un incubador a 37°C, el 7% de CO₂. Se expandieron las células hasta 40 ml en el frasco de agitación de 125 ml. Cuando la densidad celular alcanzó $1,5 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo a un frasco centrifugador de 125 ml en un volumen de cultivo de 100 ml. Se incubó el frasco a 37°C, el 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó $1,5 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo a un frasco centrifugador de 250 ml en un volumen de cultivo de 200 ml, y se incubó el frasco a 37°C, el 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó $1,5 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo a un frasco centrifugador de 1 l en un volumen de cultivo de 800 ml y se incubó a 37°C, el 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó $1,5 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo a un frasco centrifugador de 6 l en un volumen de cultivo de 5 l y se incubó a 37°C, el 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó $1,5 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo a un frasco centrifugador de 36 l en un volumen de cultivo de 20 l y se incubó a 37°C, el 7% de CO₂.

Se esterilizó un reactor de 125 l con vapor a 121°C, 20 PSI y se añadieron 65 l de medio CD CHO. Antes de su uso, se comprobó si el reactor presentaba contaminación. Cuando la densidad celular en los frascos centrifugadores de 36 l alcanzó $1,8 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se transfirieron 20 l de cultivo celular desde los frascos centrifugadores de 36 l hasta el biorreactor de 125 l (Braun), dando como resultado un volumen final de 85 l y una densidad de siembra de aproximadamente 4×10^5 células/ml. Los parámetros fueron punto de ajuste de temperatura, 37°C; pH: 7,2; oxígeno disuelto: 25% ± 10%; velocidad del impulsor 50 rpm; presión del recipiente 3 psi; rociado de aire 1 l/min; recubrimiento de aire: 1 l/min. Se tomaron muestras del reactor diariamente para los recuentos celulares, la verificación del pH, el análisis del medio, la producción y retención de proteína. Se añadieron alimentaciones de nutrientes durante la ejecución. En el día 6, se añadieron 3,4 l de medio de alimentación n.º 1 (CD CHO + glucosa

50 g/l + GlutaMAX™-1 40 ml/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 36,5°C. En el día 9, se añadieron 3,5 l de alimentación n.º 2 (CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX™-1 40 ml/l + butirato de sodio 1,1 g/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 36°C. En el día 11, se añadieron 3,7 l de alimentación n.º 3 (CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX™-1 40 ml/l + butirato de sodio 1,1 g/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 35,5°C. Se cosechó el reactor a los 14 días o cuando la viabilidad de las células descendió por debajo del 50%. El procedimiento dio como resultado la producción de rHuPH20 soluble con una actividad enzimática de 1600 unidades/ml con una densidad celular máxima de 8 millones de células/ml. En la cosecha, se tomaron muestras del cultivo para la detección de micoplasmas, carga biológica, endotoxinas y virus *in vitro* e *in vivo*, microscopía electrónica de transmisión (TEM) para detectar partículas virales, y actividad enzimática.

Se filtró la cosecha de cultivo celular de biorreactor de cien litros a través de una serie de filtros de cápsulas desechables que tenían un medio de polietersulfona (Sartorius): en primer lugar a través de una cápsula de 8,0 µm de profundidad, una cápsula de 0,65 µm de profundidad, una cápsula de 0,22 µm, y finalmente a través de un filtro de 2000 cm² de Sartopore de 0,22 µm y dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 100 l. Se concentró el cultivo 10x usando dos filtros de MWCO de 30 kDa de TFF con polietersulfona espiral (Millipore), seguido por un intercambio de tampón 6x con HEPES 10 mM, Na₂SO₄ 25 mM, pH 7,0 en un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. La tabla 19 proporciona datos de monitorización relacionados con las etapas de cultivo celular, cosecha, concentración e intercambio de tampón.

| Tabla 19. Datos de monitorización para las etapas de cultivo celular, cosecha, concentración e intercambio de tampón. | | | | |
|---|----------|-----------|----------|----------|
| Parámetro | HUA0406C | HUA04010C | HUA0415C | HUA0420C |
| Tiempo desde la descongelación hasta inocular el biorreactor de 100 l (días) | 21 | 19 | 17 | 18 |
| Densidad de inoculación de 100 l (x 10 ⁶ células/ml) | 0,45 | 0,33 | 0,44 | 0,46 |
| Tiempo de duplicación en crecimiento logarítmico (h) | 29,8 | 27,3 | 29,2 | 23,5 |
| Densidad celular máxima (x 10 ⁶ células/ml) | 5,65 | 8,70 | 6,07 | 9,70 |
| Viabilidad de la cosecha (%) | 41 | 48 | 41 | 41 |
| Título de la cosecha (U/ml) | 1964 | 1670 | 991 | 1319 |
| Tiempo en biorreactor de 100 l (días) | 13 | 13 | 12 | 13 |
| Volumen de cosecha clarificada (ml) | 81800 | 93300 | 91800 | 89100 |
| Ensayo enzimático de cosecha clarificada (U/ml) | 2385 | 1768 | 1039 | 1425 |
| Ensayo enzimático de concentrado (U/ml) | 22954 | 17091 | 8561 | 17785 |
| Ensayo enzimático de concentrado con intercambio de tampón (U/ml) | 15829 | 11649 | 9915 | 8679 |
| Ensayo enzimático de concentrado con intercambio de tampón filtrado (U/ml) | 21550 | 10882 | 9471 | 8527 |
| Volumen de concentrado con intercambio de tampón (ml) | 10699 | 13578 | 12727 | 20500 |
| Razón concentración/cosecha en unidades enzimáticas | 0,87 | 0,96 | 1,32 | 1,4 |

Se preparó una columna de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia) (3 l de resina, altura = 20 cm, diámetro = 14 cm). Se recogieron muestras de lavado para la determinación del pH, la conductividad y el ensayo de endotoxinas (LAL). Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. Se cargó la cosecha concentrada, diafiltrada sobre la columna Q a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. Se eluyó la proteína con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 y se filtró a través de un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril.

A continuación se realizó cromatografía de interacción hidrófoba de Phenyl-Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna de Phenyl-Sepharose (PS) (9,1 l de resina, altura = 29 cm, diámetro = 20 cm). Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. Se complementó el eluato de proteína de lo anterior con disoluciones madre de sulfato de amonio 2 M, fosfato de potasio 1 M y CaCl₂ 1 M hasta concentraciones finales de 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. Se cargó la proteína sobre la columna PS a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se añadieron fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 mM pH 7,0 a 100 cm/h. Se hizo pasar el flujo a través de un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril.

Se cargó la proteína purificada en PS sobre una columna de boronato de aminofenilo (ProMedics) (6,3 l de resina, altura = 20 cm, diámetro = 20 cm) que se había equilibrado con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. Se hizo pasar la proteína a través de la columna a una velocidad de flujo de

100 cm/h, y se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. Entonces se lavó la columna con bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0 y se eluyó la proteína con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM pH 6,9 a través de un filtro estéril y dentro de una bolsa estéril de 20 l. Se sometió a prueba el eluato para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Se equilibró una columna de hidroxapatita (HAP) (BioRad) (1,6 l de resina, altura = 10 cm, diámetro = 14 cm) con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM pH 7,0. Se recogieron muestras de lavado y se sometieron a prueba para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). Se complementó la proteína purificada en boronato de aminofenilo con fosfato de potasio y CaCl₂ para producir concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y CaCl₂ 0,1 mM y se cargó sobre la columna de HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, luego fosfato de potasio 10 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM pH. Se eluyó la proteína con fosfato de potasio 70 mM pH 7,0 y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril de 5 l. Se sometió a prueba el eluato para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Entonces se bombeó la proteína purificada en HAP a través de un filtro de eliminación de virus 20 nm por medio de un tanque de presión. Se añadió la proteína al tanque de presión DV20 y filtro (Pall Corporation), haciéndola pasar a través de un filtro Ultipor DV20 con poros de 20 nm (Pall Corporation) dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. Se sometió a prueba el filtrado para determinar la concentración de proteína, la actividad enzimática, el perfil de oligosacáridos, monosacáridos y ácidos siálicos, e impurezas relacionadas con el procedimiento. Entonces se concentró la proteína en el filtrado hasta 1 mg/ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) (Sartorius) Sartocoon Slice de punto de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD. Se preparó en primer lugar el filtro lavando con una disolución de Hepes/solución salina (Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7,0) y se tomaron muestras del permeado para determinar el pH y la conductividad. Tras la concentración, se tomaron muestras de la proteína concentrada y se sometieron a prueba para determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática. Se realizó un intercambio de tampón 6x sobre la proteína concentrada en el tampón final: Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7,0. Se hizo pasar la proteína concentrada a través de un filtro de 0,22 µm dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. Se tomaron muestras de la proteína y se sometieron a prueba para determinar la concentración de proteína, la actividad enzimática, los grupos sulfhidrilo libres, el perfil de oligosacáridos y la osmolaridad.

Las tablas 20 a 26 proporcionan datos de monitorización relacionados con cada una de las etapas de purificación descritas anteriormente, para cada lote de células 3D35M.

| Parámetro | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|---|----------|----------|----------|----------|
| Volumen de carga (ml) | 10647 | 13524 | 12852 | 20418 |
| Razón de volumen de carga/volumen de resina | 3,1 | 4,9 | 4,5 | 7,3 |
| Volumen de columna (ml) | 2770 | 3840 | 2850 | 2880 |
| Volumen de eluato (ml) | 6108 | 5923 | 5759 | 6284 |
| Conc. de proteína del eluato (mg/ml) | 2,8 | 3,05 | 2,80 | 2,86 |
| Ensayo enzimático del eluato (U/ml) | 24493 | 26683 | 18321 | 21052 |
| Rendimiento enzimático (%) | 65 | 107 | 87 | 76 |

| Parámetro | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|--|----------|----------|----------|----------|
| Volumen antes de la adición de disolución madre (ml) | 5670 | 5015 | 5694 | 6251 |
| Volumen de carga (ml) | 7599 | 6693 | 7631 | 8360 |
| Volumen de columna (ml) | 9106 | 9420 | 9340 | 9420 |
| Razón de volumen de carga/volumen de resina | 0,8 | 0,71 | 0,82 | 0,89 |
| Volumen de eluato (ml) | 16144 | 18010 | 16960 | 17328 |
| Conc. de proteína del eluato (mg/ml) | 0,4 | 0,33 | 0,33 | 0,38 |
| Ensayo enzimático del eluato (U/ml) | 8806 | 6585 | 4472 | 7509 |
| Rendimiento de proteína (%) | 41 | 40 | 36 | 37 |
| Rendimiento enzimático (%) | 102 | 88 | 82 | 96 |

| Parámetro | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|---|----------|----------|----------|----------|
| Volumen de carga (ml) | 16136 | 17958 | 16931 | 17884 |
| Razón de volumen de carga/volumen de resina | 2,99 | 3,15 | 3,08 | 2,98 |
| Volumen de columna (ml) | 5400 | 5700 | 5500 | 5300 |
| Volumen de eluato (ml) | 17595 | 22084 | 20686 | 19145 |
| Conc. de proteína del eluato (mg/ml) | 0,0 | 0,03 | 0,03 | 0,04 |

| | | | | |
|---|----------------------|------|------|------|
| Conc. de proteína del eluato filtrado (mg/ml) | no sometido a prueba | 0,03 | 0,00 | 0,04 |
| Ensayo enzimático del eluato (U/ml) | 4050 | 2410 | 1523 | 4721 |
| Rendimiento de proteína (%) | 0 | 11 | 11 | 12 |
| Rendimiento enzimático (%) | no determinado | 41 | 40 | 69 |

| Parámetro | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|--|----------------------|----------|----------|----------|
| Volumen antes de la adición de disolución madre (ml) | 16345 | 20799 | 20640 | 19103 |
| Razón de volumen de carga/volumen de resina | 10,95 | 13,58 | 14,19 | 12,81 |
| Volumen de columna (ml) | 1500 | 1540 | 1462 | 1500 |
| Volumen de carga (ml) | 16429 | 20917 | 20746 | 19213 |
| Volumen de eluato (ml) | 4100 | 2415 | 1936 | 2419 |
| Conc. de proteína del eluato (mg/ml) | no sometido a prueba | 0,24 | 0,17 | 0,23 |
| Conc. de proteína del eluato filtrado (mg/ml) | NA | NA | 0,17 | NA |
| Ensayo enzimático del eluato (U/ml) | 14051 | 29089 | 20424 | 29826 |
| Rendimiento de proteína (%) | no sometido a prueba | 93 | 53 | 73 |
| Rendimiento enzimático (%) | 87 | 118 | 140 | 104 |

| Parámetro | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|---|----------------------|----------|----------|----------|
| Volumen inicial (ml) | 4077 | 2233 | 1917 | 2419 |
| Volumen de filtrado (ml) | 4602 | 3334 | 2963 | 3504 |
| Conc. de proteína del filtrado (mg/ml) | 0,1 | NA | 0,09 | NA |
| Conc. de proteína del eluato filtrado (mg/ml) | NA | 0,15 | 0,09 | 0,16 |
| Rendimiento de proteína (%) | no sometido a prueba | 93 | 82 | 101 |

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

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

5 Se llenaron en viales estériles de manera aseptica con volúmenes de llenado de 5 ml y 1 ml con proteína rHuPH20 soluble purificada y concentrada. Se hizo pasar la proteína a través de un filtro de 0,22 μm hasta una bomba controlada por operario que se usó para llenar los viales usando una lectura gravimétrica. Se cerraron los viales con tapones y se sujetaron con tapones engarzados. Se inspeccionaron visualmente los viales cerrados para detectar partículas foráneas y luego se marcaron. Tras el marcaje, se congelaron instantáneamente los viales mediante inmersión en nitrógeno líquido durante no más de 1 minuto y se almacenaron a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ ($-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$).

Ejemplo 14

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

Se adaptó la línea celular 3D35M Gen1 descrita en el ejemplo 13 a niveles de metotrexato superiores para producir clones de generación 2 (Gen2). Se sembraron células 3D35M a partir de cultivos que contenían metotrexato establecidos en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 1,0 μM . Se adaptaron las células a un nivel de metotrexato superior haciéndolas crecer y pasándolas 9 veces a lo largo de un periodo de 46 días en un incubador humidificado a 37°C, el 7% de CO₂. Se clonó la población de células amplificada mediante dilución

limitante en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían medio con metotrexato 2,0 μM . Tras aproximadamente 4 semanas, se identificaron los clones y se seleccionó el clon 3E10B para la expansión. Se hicieron crecer células 3E10B en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 2,0 μM durante 20 pases. Se creó un banco de células maestras (MCB) de la línea celular 3E10B y se congeló y usó para estudios posteriores.

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

Las células 2B2 resultantes son células DG44 CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan PH20 humana recombinante (rHuPH20) soluble. La PH20 soluble está presente en células 2B2 a un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis de inmunotransferencia de tipo Southern de ADN de células 2B2 digerido con Spe I, Xba I y BamH I/Hind III usando una sonda específica de rHuPH20 reveló el siguiente perfil de digestos de restricción: una banda de hibridación principal de $\sim 7,7$ kb y cuatro bandas de hibridación minoritarias ($\sim 13,9$, $\sim 6,6$, $\sim 5,7$ y $\sim 4,6$ kb) con ADN digerido con Spe I; una banda de hibridación principal de $\sim 5,0$ kb y dos bandas de hibridación minoritarias ($\sim 13,9$ y $\sim 6,5$ kb) con ADN digerido con Xba I; y una banda de hibridación individual de $\sim 1,4$ kb observada usando ADN de 2B2 digerido con BamH I/Hind III. El análisis de secuencia del transcrito de ARNm indicó que el ADNc derivado (SEQ ID NO: 139) era idéntico a la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 110) excepto por una diferencia de un par de bases en la posición 1131, que se observó que era timidina (T) en lugar de la citosina esperada (C). Esta es una mutación silenciosa, sin efecto sobre la secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 15.

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

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

Se esterilizó un reactor de 400 l y se añadieron 230 ml de medio CD-CHO. Antes de su uso, se comprobó si el reactor presentaba contaminación. Se transfirieron aproximadamente 30 l de células de los frascos centrifugadores de 36 l al biorreactor de 400 l (Braun) a una densidad de inoculación de $4,0 \times 10^5$ células viables por ml y un volumen total de 260 l. Los parámetros fueron punto de ajuste de temperatura, 37°C; velocidad del impulsor 40-55 RPM; presión del recipiente: 3 psi; rociado de aire 0,5-1,5 l/min; recubrimiento de aire: 3 l/min. Se tomaron muestras del reactor diariamente para los recuentos celulares, la verificación del pH, el análisis del medio, la producción y retención de proteína. Además, durante la ejecución se añadieron alimentaciones de nutrientes. A las 120 h (día 5), se añadieron 10,4 l de medio de alimentación n.º 1 (4x CD-CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 160 ml/l + Yeastolate 83 ml/l + insulina humana recombinante 33 mg/l). A las 168 horas (día 7), se añadieron 10,8 l de alimentación n.º 2 (2x CD-CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 80 ml/l + Yeastolate 167 ml/l + butirato de sodio 0,92 g/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 36,5°C. A las 216 horas (día 9), se añadieron 10,8 l de alimentación n.º 3 (1x CD-CHO + glucosa 50 g/l + Glutamax-1™ 50 ml/l + Yeastolate 250 ml/l + butirato de sodio 1,80 g/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 36°C. A las 264 horas (día 11), se añadieron 10,8 l de alimentación n.º 4 (1x CD-CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 33 ml/l + Yeastolate 250 ml/l + butirato de sodio 0,92 g/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 35,5°C. Se observó que la adición de los medios de alimentación potenciaba drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en las fases de producción finales. Se cosechó el reactor a los 14 ó 15 días o cuando la viabilidad de las células descendió por debajo del 40%. El procedimiento dio como resultado una productividad final de 17.000 unidades por ml con una densidad celular máxima de 12 millones de células/ml. En la

cosecha, se tomaron muestras del cultivo para detectar micoplasmas, carga biológica, endotoxinas y virus *in vitro* e *in vivo*, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y actividad enzimática.

5 Se bombeó el cultivo mediante una bomba peristáltica a través de cuatro módulos del sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, conteniendo cada uno una capa de tierra de diatomeas graduada hasta 4-8 μm y una capa de tierra de diatomeas graduada hasta 1,4-1,1 μm , seguido por una membrana de celulosa, luego a través de un segundo sistema de filtración Millistak individual (Millipore) que contenía una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 μm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 μm , seguido por una membrana de celulosa, y luego a través de un filtro final de 0,22 μm final dentro de una bolsa flexible de uso único estéril con una capacidad de 350 l. Se complementó el fluido de cultivo celular cosechado con EDTA 10 mM y Tris 10 mM hasta un pH de 7,5. Se concentró el cultivo 10x con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) usando cuatro filtros de polietersulfona (PES) (Sartorius) con un punto de corte de peso molecular (MWCO) de 30 kDa Sartoslice TFF, seguido por un intercambio de tampón 10x con Tris 10 mM, Na_2SO_4 20mM, pH 7,5 en un filtro final de 0,22 μm dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 50 l.

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

20 B. Purificación de rHuPH20 soluble Gen2

Se preparó una columna de intercambio iónico de Q Sepharose (Pharmacia) (9 l de resina, H= 29 cm, D= 20 cm). Se recogieron muestras de lavado para la determinación del pH, la conductividad y el ensayo de endotoxinas (LAL). Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM, pH 7,5. Tras la inactivación viral, se cargo la cosecha concentrada, diafiltrada sobre la columna Q a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM, pH 7,5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. Se eluyó la proteína con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 en un filtro final de 0,22 μm dentro de una bolsa estéril. Se sometió a prueba la muestra de eluato para determinar la carga biológica, concentración de proteína y actividad hialuronidasa. Se tomó una lectura de absorbancia de A_{280} al comienzo y al final del intercambio.

35 A continuación se realizó cromatografía de interacción hidrófoba de Phenyl-Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna de phenyl sepharose (PS) (19-21 l de resina, H=29 cm, D= 30 cm). Se recogió el lavado y se tomaron muestras para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl_2 0,1 mM, pH 7,0. Se complementó el eluato de proteína de la columna de Q sepharose con disoluciones madre de sulfato de amonio 2 M, fosfato de potasio 1 M y CaCl_2 1 M para producir concentraciones finales de 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. Se cargó la proteína sobre la columna de PS a una velocidad de flujo de 100 cm/h y se recogió la fracción no retenida de la columna. Se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl_2 0,1 mM pH 7,0 a 100 cm/h y se añadió el lavado a la fracción no retenida recogida. Combinado con el lavado de la columna, se hizo pasar la fracción no retenida a través de un filtro final de 0,22 μm dentro de una bolsa estéril. Se tomaron muestras de la fracción no retenida para determinar la carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

45 Se preparó una columna de boronato de aminofenilo (Prometics). Se recogió el lavado y se tomaron muestras para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. Se cargó la fracción no retenida de PS que contenía proteína purificada sobre la columna de boronato de aminofenilo a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. Se lavó la columna con bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0. Se lavó la columna con bicina 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 9,0. Se eluyó la proteína con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6,9 y se hizo pasar a través de un filtro estéril dentro de una bolsa estéril. Se sometió a prueba la muestra eluida para determinar la carga biológica, proteína concentración y actividad enzimática.

55 Se preparó la columna de hidroxiapatita (HAP) (Biorad). Se recogió el lavado y se sometió a prueba para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). Se equilibró la columna con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM, pH 7,0. Se complementó la proteína purificada en boronato de aminofenilo hasta concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y CaCl_2 0,1 mM y se cargó sobre la columna de HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM. 60 A continuación se lavó la columna con fosfato de potasio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM. Se eluyó la proteína con fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 y se hizo pasar a través de un filtro estéril de 0,22 μm dentro de una bolsa estéril. Se sometió a prueba la muestra eluida para determinar la carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

65 Entonces se hizo pasar la proteína purificada en HAP a través de un filtro de eliminación de virus. Se preparó el filtro

- Viosart esterilizado (Sartorius) en primer lugar lavando con 2 l de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0. Antes de su uso, se tomaron muestras del tampón filtrado para determinar el pH y la conductividad. Se bombeó la proteína purificada en HAP por medio de una bomba peristáltica a través del filtro de eliminación de virus 20 nM. Se hizo pasar la proteína filtrada en fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 a través de un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril.
- 5 Se sometió a prueba la muestra con virus filtrados para determinar la concentración de proteína, actividad enzimática, perfil de oligosacáridos, monosacáridos y ácidos siálicos. También se sometió a prueba la muestra para determinar impurezas relacionadas con el procedimiento.
- 10 Entonces se concentró la proteína en el filtrado hasta 10 mg/ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) (Sartorius) de punto de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD Sartocon Slice. Se preparó el filtro en primer lugar lavando con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0 y se tomaron muestras del permeado para determinar el pH y la conductividad. Tras la concentración, se tomaron muestras de la proteína concentrada y se sometieron a prueba para determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática. Se realiza un intercambio de tampón 6x sobre la proteína concentrada en el tampón final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0.
- 15 Tras el intercambio de tampón, se hizo pasar la proteína concentrada a través de un filtro de 0,22 µm dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. Se tomaron muestras de la proteína y se sometieron a prueba para determinar la concentración de proteína, la actividad enzimática, los grupos sulfhidrilo libres, el perfil de oligosacáridos y la osmolaridad.
- 20 Entonces se dispensó de manera estéril la proteína a granel filtrada estéril a 20 ml en viales de teflón estériles de 30 ml (Nalgene). Entonces se congelaron instantáneamente los viales y se almacenaron a -20 ± 5°C.
- C. Comparación de la producción y purificación de rHuPH20 soluble Gen1 y rHuPH20 soluble Gen2
- 25 La producción y purificación de rHuPH20 soluble Gen2 en un cultivo celular en biorreactor de 300 l contenía algunos cambios en los protocolos en comparación con la producción y purificación rHuPH20 soluble Gen1 en un cultivo celular en biorreactor de 100 l (descrito en el ejemplo 13B). La tabla 27 expone diferencias a modo de ejemplo, además de cambios de aumento a escala sencillos, entre los métodos.

| Diferencia de procedimiento | rHuPH20 soluble Gen1 | rHuPH20 soluble Gen2 |
|---|---|--|
| Línea celular | 3D35M | 2B2 |
| Medio usado para expandir el inóculo celular | Contiene metotrexato 0,10 µM (0,045 mg/l) | Contiene metotrexato 20 µM (9 mg/l) |
| Medio en cultivos de 6 l en adelante | Contiene metotrexato 0,10 µM | No contiene metotrexato |
| Frasco centrifugador de 36 l | Sin instrumentación Volumen de funcionamiento de 20 l. | Equipado con instrumentación que monitoriza y controla el pH, el oxígeno disuelto, el rociado y la velocidad de flujo de gas de rociado y recubrimiento. Volumen de funcionamiento de 32 l |
| Volumen de funcionamiento final en el biorreactor | Aproximadamente 100 l en un biorreactor de 125 l (volumen de cultivo inicial + 65 l) | Aproximadamente 300 l en un biorreactor de 400 l (volumen de cultivo inicial + 260 l) |
| Medio de cultivo en el biorreactor final | Sin insulina humana recombinante | Insulina humana recombinante 5,0 mg/l |
| Volumen de alimentación de medios | Aumentado de escala al 4% del volumen de cultivo celular del biorreactor, es decir 3,4, 3,5 y 3,7 l, dando como resultado un volumen de biorreactor diana de ~92 l. | Aumentado de escala al 4% del volumen de cultivo celular del biorreactor, es decir 10,4, 10,8, 11,2 y 11,7 l, dando como resultado un volumen de biorreactor diana de ~303 l. |
| Alimentación de medios | Medio de alimentación n.º 1: CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX™-1 8 mM Alimentación n.º 2 (CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX 8 mM + butirato de sodio 1,1 g/l Alimentación n.º 3: CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX 8 mM + butirato de sodio 1,1 g/l | Medio de alimentación n.º 1: 4x CD CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax 32 mM + Yeastolate 16,6 g/l + insulina humana recombinante 33 mg/l Alimentación n.º 2: 2x CD CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax 16 mM + Yeastolate 33,4 g/l + butirato de sodio 0,92 g/l Alimentación n.º 3: 1x CD CHO + glucosa 50 g/l + Glutamax 10 mM + |

| | | |
|---|---|--|
| | | Yeastolate 50 g/l + butirato de sodio 1,80 g/l Alimentación n.º 4: 1x CD CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax 6,6 mM + Yeastolate 50 g/l + butirato de sodio 0,92 g/l |
| Filtración de cultivo celular en biorreactor | Cuatro filtros de polietersulfona (8,0 µm, 0,65 µm, 0,22 µm y 0,22 µm) en serie Bolsa de almacenamiento de 100 l | 1ª fase - Cuatro módulos en paralelo, cada uno con una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 2ª fase – Módulo individual que contiene una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 3ª fase – Filtro de polietersulfona de 0,22 µm Bolsa de almacenamiento de 300 l El cultivo celular recogido se complementa con EDTA 10 mM, Tris 10 mM a un pH de 7,5 |
| Concentración e intercambio de tampón antes de la cromatografía | Concentrado con 2 TFF con filtro de MWCO de 30 K de polietersulfona Millipore Spiral Intercambio de tampón del concentrado 6x con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0 Bolsa de almacenamiento estéril de 20 l | Concentrado usando cuatro filtros de MWCO de 30 K Sartorius Sartoslice TFF Intercambio de tampón del concentrado 10x con Tris 10 mM, Na ₂ SO ₄ 20 mM , pH 7,5 Bolsa de almacenamiento estéril de 50 l |
| Inactivación viral antes de la cromatografía | Ninguna | Inactivación viral realizada con la adición de un Triton® X-100 al 1%, fosfato de tributilo al 0,3%, pH 7,5, |
| 1ª etapa de purificación (Q sepharose) | Sin lectura de absorbancia | Mediciones a A280 al comienzo y al final |
| Filtración viral tras la cromatografía | Filtro Pall DV-20 (20 nm) | Filtro Sartorius Virosart (20 nm) |
| Concentración e intercambio e tampón tras cromatografía | Tampón Hepes/solución salina pH 7,0 Proteína concentrada hasta 1 mg/ml | Tampón histidina/solución salina pH 6,0 Proteína concentrada hasta 10 mg/ml |

Ejemplo 16

Determinación del contenido en ácidos siálicos y monosacáridos

- 5 El contenido en ácidos siálicos y monosacáridos de rHuPH20 soluble puede evaluarse mediante cromatografía de líquidos de fase inversa (RPLC) tras hidrólisis con ácido trifluoroacético. En un ejemplo, se determinó el contenido en ácidos siálicos y monosacáridos de hialuronidasa purificada lote n.º HUB0701 E (1,2 mg/ml; producida y purificada esencialmente tal como se describe en el ejemplo 15). En resumen, se hidrolizaron 100 µg de muestra con ácido trifluoroacético al 40% (v/v) a 100°C durante 4 horas por duplicado. Tras la hidrólisis, se secaron las muestras y se resuspendieron en 300 µl de agua. Se transfirió una alícuota de 45 µl de cada muestra resuspendida a un tubo nuevo y se secó, y se añadieron 10 µl de una disolución de acetato de sodio 10 mg/ml a cada uno. Se marcaron fluorescentemente los monosacáridos liberados mediante la adición de 50 µl de una disolución que contenía ácido 2-aminobenzoico 30 mg/ml, cianoborohidruro de sodio 20 mg/ml, acetato de sodio aproximadamente 40 mg/ml y ácido bórico 20 mg/ml en metanol. Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 80°C en la oscuridad. Se extinguió la reacción de derivatización mediante la adición de 440 µl de fase móvil A (n-butilamina al 0,2% (v/v), ácido fosfórico al
- 10
- 15

0,5% (v/v), tetrahidrofurano al 1% (v/v)). También se hidrolizó un blanco de matriz y se derivatizó tal como se describe para la muestra de hialuronidasa como control negativo. Se separaron los monosacáridos liberados mediante RPLC usando una columna de fase inversa de octadecilo (C₁₈) (4,6 x 250 mm, tamaño de partícula de 5 µm; J.T. Baker) y se monitorizó mediante detección de fluorescencia (360 nm de excitación, 425 nm de emisión). Se realizó la cuantificación del contenido en monosacáridos mediante comparación de los cromatogramas de la muestra de hialuronidasa con los cromatogramas de los patrones de monosacáridos que incluían N-D-glucosamina (GlcN), N-D-galactosamina (GalN), galactosa, fucosa y manosa. La tabla 28 presenta la razón molar de cada monosacárido por molécula de hialuronidasa.

| Lote | Réplica | GlcN | GalN | Galactosa | Manosa | Fucosa |
|----------|----------|-------|-------|-----------|--------|--------|
| HUB0701E | 1 | 14,28 | 0,07* | 6,19 | 25,28 | 2,69 |
| | 2 | 13,66 | 0,08* | 6,00 | 24,34 | 2,61 |
| | Promedio | 13,97 | 0,08* | 6,10 | 24,81 | 2,65 |

*Los resultados de GalN estaban por debajo del límite de detección

Ejemplo 17

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

Se realizó secuenciación C-terminal en dos lotes de sHuPH20 producida y purificada a partir de células 3D35M en un volumen de biorreactor de 100 L (lote HUA0505MA) y células 2B2 en un volumen de biorreactor de 300 l (lote HUB0701EB). Se digirieron los lotes por separado con endoproteinasa Asp-N, que escinde específicamente enlaces peptídicos en el extremo N-terminal en ácido aspártico y cisteico. Esto libera la parte C-terminal de la rHuPH20 soluble en el ácido aspártico en la posición 431 de SEQ ID NO: 122. Se separaron los fragmentos C-terminales y se caracterizaron para determinar la secuencia y abundancia de cada población en el lote HUA0505MA y el lote HUB0701EB.

Se observe que las preparaciones de rHuPH20 soluble a partir de células 3D35M y células 2B2 presentaban heterogeneidad, y contenían polipéptidos que diferían entre sí en su secuencia C-terminal (tablas 30 y 31). Esta heterogeneidad es el resultado de la escisión C-terminal del polipéptido de 447 aminoácidos expresado (SEQ ID NO: 122) por peptidasas presentes en el medio de cultivo celular u otras disoluciones durante el procedimiento de producción y purificación. Los polipéptidos en las preparaciones de rHuPH20 soluble tienen secuencias de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1-447, 1-446, 1-445, 1-444 y 1-443 de la secuencia de rHuPH20 soluble expuesta en SEQ ID NO: 122. La secuencia de aminoácidos completa de cada uno de estos polipéptidos se expone en SEQ ID NO: 122 a 126, respectivamente. Tal como se indica en las tablas 29 y 30, la abundancia de cada polipéptido en las preparaciones de rHuPH20 soluble a partir de células 3D35M y células 2B2 difiere.

| Fragmento | Posición de aminoácido (en relación con SEQ ID NO: 122) | Secuencia | Masa teor. | Masa esp. | Error | Tiempo de elución | Abundancia |
|-----------|---|------------------------------------|------------|-----------|-------|-------------------|------------|
| D28a | 431-447 | DAFKLPPMETEEPQIFY (SEQ ID NO: 191) | 2053,97 | 2054,42 | 0,45 | 99,87 | 0,2% |
| D28b | 431-446 | DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO: 192) | 1890,91 | 1891,28 | 0,37 | 97,02 | 18,4% |
| D28c | 431-445 | DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO: 193) | 1743,84 | 1744,17 | 0,33 | 86,4 | 11,8% |
| D28d | 431-444 | DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO: 194) | 1630,70 | 1631,07 | 0,32 | 74,15 | 56,1% |
| D28e | 431-443 | DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO: 195) | 1502,70 | 1502,98 | 0,28 | 77,36 | 13,6% |
| D28f | 431-442 | DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO: 196) | 1405,64 | ND | N/A | N/A | 0,0% |

| Fragmento | Posición de aminoácido (en relación con SEQ ID NO: 122) | Secuencia | Masa teor. | Masa esp. | Error | Tiempo de elución | Abundancia |
|-----------|---|-------------------|------------|-----------|-------|-------------------|------------|
| D28a | 431-447 | DAFKLPPMETEEPQIFY | 2053,97 | 2054,42 | 0,45 | 99,89 | 1,9% |

| | | | | | | | |
|------|---------|--------------------------------------|---------|---------|------|-------|-------|
| | | (SEQ ID NO: 191) | | | | | |
| D28b | 431-446 | DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO: 192) | 1890,91 | 1891,36 | 0,45 | 96,92 | 46,7% |
| D28c | 431-445 | DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO: 193) | 1743,84 | 1744,24 | 0,40 | 85,98 | 16,7% |
| D28d | 431-444 | DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO: 194) | 1630,70 | 1631,14 | 0,39 | 73,9 | 27,8% |
| D28e | 431-443 | DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO: 195) | 1502,70 | 1503,03 | 0,33 | 77,02 | 6,9% |
| D28f | 431-442 | DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO: 196) | 1405,64 | ND | N/A | N/A | 0,0% |

La presente divulgación también incluye los siguientes puntos.

PUNTOS:

- 5
1. Una hialuronidasa PH20 soluble extendida (esPH20).
 2. Una esPH20 del punto 1 que está N-glicosilada, N-parcialmente N-glicosilada o está desglicosilada.
- 10
3. Una esPH20 del punto 1 o el punto 2, en la que el polipéptido parcialmente N-glicosilado comprende al menos un resto de N-acetilglucosamina unido a cada uno de al menos tres residuos de asparagina (N).
 4. Una esPH20 del punto 3, en la que los tres residuos de asparagina son los residuos de aminoácido 235, 368 y 393 de SEQ ID NO: 107 o son residuos correspondientes a los residuos de aminoácido 235, 368 y 393 de SEQ ID NO: 107.
- 15
5. Una esPH20 de cualquiera de los puntos 1-4 que se selecciona de entre:

un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 60-63 y 102-104; o

un polipéptido que contiene sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 60-63 y 102-104, mediante lo cual el polipéptido con aminoácidos sustituidos consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85%, el 87%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con la secuencia de aminoácidos correspondiente expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 60-63 y 102-104.
- 25
6. Una esPH20 de cualquiera de los puntos 1-5 que es activa neutra.
 7. Una esPH20 de cualquiera de los puntos 1-5 que es una esPH20 humana.
 8. Una esPH20 de cualquiera de los puntos 1-4 que es una esPH20 de chimpancé.
 9. Una esPH20 del punto 5 que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 60-63 y 102-104.
- 30
10. Una esPH20 de cualquiera de los puntos 1-4 que se selecciona de entre:

un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107; o

un polipéptido que contiene sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107, mediante lo cual el polipéptido con aminoácidos sustituidos consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85%, el 87%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con la secuencia de aminoácidos correspondiente expuesta como aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107.
- 40
11. Una esPH20 del punto 10 que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107.
 12. Una hialuronidasa PH20 truncada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 1-465, 1-491, 1-492, 1-493, 1-494, 1-495, 1-496, 1-497, 1-498, 1-499 ó 1-500 de SEQ ID NO: 107; o
- 45
- 50

- 5 contiene sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 1-465, 1-491, 1-492, 1-493, 1-494, 1-495, 1-496, 1-497, 1-498, 1-499 ó 1-500 de SEQ ID NO: 107, mediante lo cual la hialuronidasa PH20 con aminoácidos sustituidos consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85%, el 87%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 1-465, 1-491, 1-492, 1-493, 1-494, 1-495, 1-496, 1-497, 1-498, 1-499 ó 1-500 de SEQ ID NO: 107.
- 10 13. Una hialuronidasa PH20 truncada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-465, 36-484, 36-485, 36-486, 36-487, 36-488 ó 36-489 de SEQ ID NO: 107, o contiene sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-465, 36-484, 36-485, 36-486, 36-487, 36-488 ó 36-489 de SEQ ID NO: 107, mediante lo cual la hialuronidasa PH20 con aminoácidos sustituidos consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85%, el 87%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-465, 36-484, 36-485, 36-486, 36-487, 36-488 ó 36-489 de SEQ ID NO: 107.
- 15 14. Una PH20 del punto 12 o el punto 13 que está N-glicosilada, parcialmente N-glicosilada o está desglucosilada.
- 15 15. Una PH20 de cualquiera de los puntos 12-14 que es activa neutra.
- 20 16. Una glicoproteína hialuronidasa PH20 truncada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 55-106, o contiene sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 55-106, mediante lo cual la hialuronidasa PH20 con aminoácidos sustituidos consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85%, el 87%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 55-106, en el que la glicoproteína hialuronidasa PH20 está N-glicosilada pero no está glicosilada en uno o más residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 82, 166 ó 254 de SEQ ID NO: 107.
- 25 17. Una PH20 del punto 6 que comprende al menos un resto N-acetilglucosamina unido a cada uno de al menos tres residuos de asparagina (N).
- 30 18. Una PH20 del punto 17, en la que los tres residuos de asparagina son los residuos de aminoácido 235, 368 y 393 de SEQ ID NO: 107 o los residuos correspondientes a los residuos de aminoácido 235, 368 y 393 de SEQ ID NO: 107.
- 35 19. Una PH20 de cualquiera de los puntos 16-18 que es activa neutra.
- 35 20. Una PH20 de cualquiera de los puntos 16-19 que es soluble.
- 40 21. Una PH20 de cualquiera de los puntos 16-20, en la que la PH20 se selecciona de entre humano, chimpancé, mono rhesus y mono cynomolgus.
- 40 22. Una esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-21 que se modifica mediante modificación seleccionada de entre sialación, albuminación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación y fosforilación.
- 45 23. Una esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-21 que se modifica mediante un polímero.
- 45 24. Una esPH20 o PH20 del punto 23, en el que el polímero es dextrano o PEG.
- 50 25. Una glicoproteína hialuronidasa PH20, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 107, o una forma activa neutra truncada de la misma, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85%, el 87%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 107 o formas truncadas de la misma, en la que la glicoproteína hialuronidasa PH20 está N-glicosilada pero no está glicosilada en uno o más residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 82, 166 ó 254 de SEQ ID NO: 107.
- 55 26. Una esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-25, en la que el polipéptido se modifica para que tenga inmunogenicidad disminuida en un humano en comparación con el polipéptido sin modificar.
- 60 27. La esPH20 o PH20 del punto 26, en la que la secuencia primaria se altera para eliminar epítomos que contribuyen a la antigenicidad.
- 60 28. Una esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-25, en la que el polipéptido se produce mediante expresión en una célula huésped que no bifucosila el polipéptido.
- 65 29. La esPH20 o PH20 del punto 28, en la que la célula huésped es una célula huésped de mamífero o un sistema

de expresión de células de insecto mamiferizadas.

30. Una esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-25 que no está bifucosilada.
- 5 31. La esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-30 que está sustancialmente purificada o aislada.
32. Un conjugado, que comprende la esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-31.
- 10 33. Un conjugado del punto 32, en el que la esPH20 o PH20 se conjuga con un resto seleccionado de entre un dominio de multimerización, toxina, marcador detectable o fármaco.
34. Un conjugado del punto 33, en el que la esPH20 o PH20 se conjuga con un dominio Fc.
- 15 35. Un conjugado del punto 32, en el que la esPH20 o PH20 se conjuga con un polímero.
36. Un conjugado del punto 35, en el que el polímero es dextrano o PEG.
- 20 37. Un conjugado de cualquiera de los puntos 32-36, en el que el resto conjugado se une directamente o por medio de un ligador al extremo C-terminal o extremo N-terminal de la esPH20 o PH20.
38. Una molécula de ácido nucleico que codifica para la esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-21, en la que la molécula de ácido nucleico no codifica para una PH20 de longitud completa sino que codifica para una PH20 truncada o codifica para una esPH20.
- 25 39. Un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos que codifica para una PH20 o esPH20 de cualquiera de los puntos 1-21 incluyendo cada una o seguida inmediatamente por un codón de terminación operativamente insertado en el vector para la expresión de la PH20 o esPH20 de cualquiera de los puntos 1-21.
- 30 40. La molécula de ácido nucleico del punto 38 o el punto 39 que codifica para un polipéptido de esPH20 que consiste en los aminoácidos de 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107; o un polipéptido que contiene sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107, mediante lo cual el polipéptido de esPH20 con aminoácidos sustituidos consiste en una secuencia
- 35 de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85%, el 87%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más con la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos de 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107.
- 40 41. Una molécula de ácido nucleico que es un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 150-154, 200-201 y 213-215, o secuencias degeneradas de las mismas e incluye un codón de terminación para producir una PH20 truncada o esPH20 codificada por cualquiera de SEQ ID NO: 150-154, 200-201 y 213-215, en la que el polinucleótido está operativamente unido para su expresión para producir la PH20 truncada codificada o esPH20.
- 45 42. El ácido nucleico del punto 38 que codifica para una esPH20 que consiste en los aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497 ó 36-498 de SEQ ID NO: 107.
- 50 43. Un vector, que comprende el ácido nucleico de cualquiera de los puntos 38, 40 y 42.
44. Una célula, que comprende un vector del punto 39 ó 43 o una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 38 y 40-42.
- 55 45. La célula del punto 44 que es una célula CHO.
46. Una composición, que comprende un polipéptido de esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-31.
47. Una composición, que comprende una pluralidad de polipéptidos de esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-21.
- 60 48. Una composición, que comprende una pluralidad de polipéptidos de esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 22-31.
- 65 49. La composición de punto 47, en la que la pluralidad de polipéptidos de esPH20 está codificada por una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 38 y 40-42 o un vector del punto 39 o el punto 43.

50. La composición de cualquiera de los puntos 46-49, en la que los polipéptidos de esPH20 o PH20 se secretan a partir de células CHO.
- 5 51. Una composición de cualquiera de los puntos 46-50, que es una composición farmacéutica.
52. Una composición del punto 51 que comprende un agente terapéutico adicional.
53. La composición del punto 52, en la que el agente terapéutico se formula con la composición o en una composición diferenciada.
- 10 54. La composición del punto 52 o el punto 53, en la que el agente terapéutico se selecciona de entre un agente quimioterápico, un agente analgésico, un agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente amebicida, un agente tricomonocida, un agente antiparkinsoniano, un agente antipalúdico, un agente anticonvulsivo, un agente antidepresivo, y un agente antiartrítico, un agente antifúngico, un agente antihipertensivo, un agente antipirético, un agente antiparasitario, un agente antihistamínico, un agente agonista alfa-adrenérgico, un agente alfabloqueante, un agente anestésico, un agente broncodilatador, un agente biocida, un agente bactericida, un agente bacteriostático, un agente bloqueante beta-adrenérgico, un agente bloqueante de canales de calcio, un agente farmacológico cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente descongestivo, un agente diurético, un agente depresivo, un agente de diagnóstico, un agente de electrolito, un agente hipnótico, un agente hormonal, un agente hiperglicémico, un agente relajante muscular, un agente contractor muscular, un agente oftálmico, un agente parasimpatomimético, un agente energizante psíquico, un agente sedante, un agente simpatomimético, un agente tranquilizante, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente de vitamina, un agente antiinflamatorio no esteroideo, un agente inhibidor de enzima convertidora de angiotensina, un polipéptido, una proteína, un ácido nucleico, un fármaco, una molécula orgánica o un inductor del sueño.
- 15 20 25 55. La composición de cualquiera de los puntos 52-54, en la que el agente terapéutico se selecciona de entre un anticuerpo, una inmunoglobulina, un bisfosfonato, una citocina, un agente quimioterápico y una insulina.
- 30 56. La composición del punto 55, en la que la insulina es una insulina de acción rápida y el bisfosfonato es ácido zoledrónico.
57. Un método para tratar una enfermedad o estado asociado a hialuronano, que comprende administrar a un sujeto una esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-31 o una composición de cualquiera de los puntos 46-56.
- 35 58. Un método para tratar un exceso de glicosaminoglicanos; para tratar un tumor; para tratar la acumulación de glicosaminoglicano en el cerebro; para tratar un trastorno cardiovascular; para tratar un trastorno oftálmico; para tratar una enfermedad pulmonar; para aumentar la penetración de agentes quimioterápicos en tumores sólidos; para tratar celulitis; para tratar un trastorno proliferativo; o para aumentar la biodisponibilidad de fármacos y otros agentes terapéuticos, que comprende administrar a un sujeto una esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-31 o una composición de cualquiera de los puntos 46-56.
- 40 59. El método del punto 58, en el que el trastorno proliferativo es hiperplasia prostática benigna.
- 45 60. El método del punto 58, o la composición de cualquiera de los puntos 52-56, en la que el agente terapéutico adicional se selecciona de entre acivicinas; aclarubicinas; acodazoles; acroninas; adozelesinas; aldesleucinas; alemtuzumabs; alitretinoínas (ácidos 9-cis-retinoicos); alopurinoles; altretaminas; alvocidibs; ambazonas; ambomicinas; ametantronas; amifostinas; aminoglutetimidias; amsacinas; anastrozoles; anaxironas; ancitabinas; antramincinas; apaziquonas; argimesnas; trióxidos arsénicos; asparaginasas; asperlinas; atrimustinas; azacitidinas; azetepas; azotomicinas; banoxantronas; batabulinas; batimastats; BCG vivo; benaxibinas; bendamustinas; benzodepas; bexarotenos; bevacizumab; bicalutamidas; bietaserpinas; biricodars; bisantrenos; bisantrenos; dimesilatos de bisnafida; bizelesinas; bleomicinas; bortezomibs; brequinars; bropiriminas; budotitanos; busulfanos; cactinomicinas; calusteronas; canertinibs; capecitabinas; caracemidas; carbetímeros; carboplatinos; carboquonas; carmofurs; carmustinas con polifeprosanos; carmustinas; carubicinas; carzelesinas; cedefingoles; celecoxibs; cemadotinas; clorambucilos; cioteronels; cirolemicinas; cisplatinos; cladribinas; clanfenurs; clofarabinas; crisnatoles; ciclofosfamidas; citarabinas liposomales; citarabinas; dacarbazinas; dactinomicinas; darbepoetinas alfa; daunorubicinas liposomales; daunorubicinas/daunomicinas; daunorubicinas; decitabinas; denileucinas diftiox; dexametasonas; dexametasonas; dexametasonas; dezaguaninas; diaziquonas; dibrospidios; dienogests; dinalinas; dixeridinas; docefetaxilas; dofequidars; doxifluridinas; doxorubicinas liposomales; doxorubicina HCl; inyección de liposomas de docorubicina HCl; doxorubicinas; droloxifenos; propionatos de dromostanolona; duazomicinas; ecomustinas; edatrexatos; edotecarinas; eflornitinas; elacridars; elinafidas; disoluciones B de Elliot; elsamitrucinas; emitefurs; enloplatinos; enpromatos; enzastaurinas; epiropidinas; epirubicinas; epoetinas alfa; eptaloprosts; erbulozoles; esorubicinas; estramustinas; etanidazoles; etoglúcidos; fosfatos de etopósido; etopósidos VP-16; etopósidos; etoprinas; exemestanos; exisulinds; fadrozoles; fazarabinas; fenretinidas; filgrastims; floxuridinas; fludarabinas; fluorouracilos; 5-fluorouracilos; flouximesteronas; flurocitabinas; fosquidonas; fostriecinas; fostriecinas; fotretaminas; fulvestrants; galarubicinas; galocitabinas; gemcitabinas; gemtuzumabs/ozogamicinas; geroquinols; gimatecanos; gimeracilos; gloxazonas; glufosfamidas; acetatos de goserelina; hidroxiureas; ibritumomabs/tiuxetanos;
- 60 65

- idarubicinas; ifosfamidas; ilmofoquinas; ilomastats; mesilatos de imatinib; imexonas; improsulfanos; indisulams; inproquonas; interferones alfa-2a; interferones alfa-2b; interferones alfa; interferones beta; interferones gamma; interferones; interleucinas-2 y otras interleucinas (incluyendo interleucinas recombinantes); intoplicinas; iobenguanos [131-I]; iproplatinos; irinotecanos; irsogladinas; ixabepilonas; ketotrexatos; L-alanosinas; lanreotidas; lapatinibs; ledoxantronas; letrozoles; leucovorinas; leuprolidas; leuprorelinas (leuprorelidas); levamisoles; lexacalcitoles; liarozoles; lobaplatinos; lometrexoles; lomustinas/CCNU; lomustinas; lonafarnibs; losoxantronas; lurtotecanos; mafosfamidas; manosulfanos; marimastats; masoprocoles; maitansinas; mecloretaminas; mecloretaminas/mostazas de nitrógeno; acetatos de megestrol; megestrol; megestrol; melengestrol; melfalano; melfalano L-PAM; menogarilos; mepitiostanos; mercaptopurinas; 6-mercaptopurina; mesnas; metesinds; metotrexatos; metoxsalenos; metomidatos; metoprinas; meturedepas; miboplatinos; miproxifenos; misonidazoles; mitindomidas; mitocarcinas; mitocrominas; mitoflaxonas; mitogilinas; mitoguazonas; mitomalquinas; mitomicinas C; mitomicinas; mitonafidas; mitoquidonas; mitopers; mitotanos; mitoxantronas; mitozolomidas; mivobulinas; mizoribinas; mofarotenos; mopidamoles; mubritinibs; ácidos micofenólicos; fenpropionatos de nandrolona; nedaplatinos; nelzarabinas; nemorubicinas; nitracinas; nocodazoles; nofetumomabs; nogalamincinas; nolatrexedes; nortopixantronas; octreotidas; oprelvequinas; ormaplatinos; ortataxeles; oteracilos; oxaliplatinos; oxisuranos; sobuzoxanos; sorafenibs; esparfosatos; ácidos esparfósicos; esparsomicinas; espirogermanios; espiromustinas; espiroplatinos; espiroplatinos; escualaminas; estreptonigrinas; estreptovaricinas; estreptozocinas; sufosfamidas; sulofenurs; malato de sunitinib; 6-TG; tacedinalinas; talcos; talisomicinas; talimustinas; tamoxifenos; tariquidars; taumustinas; tecogalano; tegafurs; teloxantronas; temoporfinas; temozolomidas; tenipósidos/VM-26; tenipósidos; teroxironas; testolactonas; tiamiprinas; tioguaninas; tiotepas; tiamiprinas; tiazofurinas; tilomisoles; tiloronas; timcodars; timonacics; tirapazaminas; topixantronas; topotecanos; toremifenos; tositumomabs; trabectedinas (ecteinascidina 743); trastuzumabs; trestolonas; tretinoínas/ATRA; triciribinas; trilostanos; trimetrexatos; tetranitratos de triplatino; triptorelinas; trofosfamidas; tubulozoles; ubenimexs; mostazas de uracilo; uredepas; valrubicinas; valspodars; vapreotidas; verteporfinas; vinblastinas; vincristinas; vindesinas; vinepidinas; vinfluninas; vinformidas; vinglicinatos; vinleucinoles; vinleurosinas; vinorelbina; vinrosidinas; vintriptoles; vinzolidinas; vorozoles; xantomincinas A (guameciclinas); zeniplatinos; zilascorb [2-H]; zinostatinas; zoledronato; zorubicinas; y zosuquidars.
61. El método del punto 59, en el que PH20 o esPH20 está pegilada.
62. Uso de una esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-31 o una composición de cualquiera de los puntos 46-56 en la formulación de un medicamento para tratar una enfermedad o estado asociado a hialuronano.
63. Una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de cualquiera de los puntos 1-30 para tratar una enfermedad o estado asociado con hialuronano.
64. Una composición farmacéutica de cualquiera de los puntos 46-56 para tratar una enfermedad o estado asociado con hialuronano.
65. Uso de una esPH20 o PH20 de cualquiera de los puntos 1-31 o una composición de cualquiera de los puntos 46-56 para la formulación de un medicamento para tratar un exceso de glicosaminoglicanos; para tratar un tumor; para tratar la acumulación de glicosaminoglicanos en el cerebro; para tratar un trastorno cardiovascular; para tratar un trastorno oftálmico; para tratar una enfermedad pulmonar; para aumentar la penetración de agentes quimioterápicos en tumores sólidos; para tratar celulitis; para tratar un trastorno proliferativo; o para aumentar la biodisponibilidad de fármacos y otros agentes terapéuticos.
66. El uso del punto 65, en el que el trastorno proliferativo es hiperplasia prostática benigna.
67. Una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de cualquiera de los puntos 1-31, para su uso en el tratamiento de un exceso de glicosaminoglicanos; para tratar un tumor; para tratar la acumulación de glicosaminoglicanos en el cerebro; para tratar un trastorno cardiovascular; para tratar un trastorno oftálmico; para tratar una enfermedad pulmonar; para aumentar la penetración de agentes quimioterápicos en tumores sólidos; para tratar celulitis; para tratar un trastorno proliferativo; o para aumentar la biodisponibilidad de fármacos y otros agentes terapéuticos.
68. Una composición farmacéutica de cualquiera de los puntos 46-56 para su uso en el tratamiento de un exceso de glicosaminoglicanos; para tratar un tumor; para tratar la acumulación de glicosaminoglicanos en el cerebro; para tratar un trastorno cardiovascular; para tratar un trastorno oftálmico; para tratar una enfermedad pulmonar; para aumentar la penetración de agentes quimioterápicos en tumores sólidos; para tratar celulitis; para tratar un trastorno proliferativo; o para aumentar la biodisponibilidad de fármacos y otros agentes terapéuticos.

69. La composición farmacéutica del punto 67 o punto 68, en la que el trastorno proliferativo es hiperplasia prostática benigna.

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

ES 2 724 588 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Halozyme, Inc.
- 5 <120> Polipéptidos de PH20 soluble extendida y usos de la misma
- <130> 186030
- <150> US 61/201.384
- 10 <151> 09-12-2008
- <150> US 61/281.240
- <151> 13-11-2009
- 15 <160> 215
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- 20 <211> 1530
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- 25 <223> ADNc de PH20 humana que codifica para los aminoácidos 1-509
- <400> 1
- | | | | | | | | |
|----|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| | atgggagtg | tcaaaattcaa | gcacatcttt | ttcagaagct | ttgttaaadc | aagtggagta | 60 |
| | tcccagatag | ttttcacctt | ccttctgatt | ccatgttgct | tgactctgaa | tttcagagca | 120 |
| 30 | cctcctgtta | ttccaaatgt | gcctttcctc | tgggcctgga | atgccccaa | tgaatttgt | 180 |
| | cttggaat | ttgatgagcc | actagatatg | agcctcttct | ctttcatagg | aagccccga | 240 |
| | ataaacgcca | ccgggcaagg | tgttacaata | ttttatgttg | atagacttgg | ctactatcct | 300 |
| | tacatagatt | caatcacagg | agtaactgtg | aatggaggaa | tccccagaa | gatttcctta | 360 |
| | caagaccatc | tgacaaaagc | taagaaagac | attacatttt | atatgccagt | agacaatttg | 420 |
| 35 | ggaatggctg | ttattgactg | ggaagaatgg | agaccactt | gggcaagaaa | ctggaaacct | 480 |
| | aaagatgttt | acaagaatag | gtctattgaa | ttggttcagc | aacaaaatgt | acaacttagt | 540 |
| | ctcacagagg | ccactgagaa | agcaaaaaca | gaatttgaaa | aggcagggaa | ggatttcctg | 600 |
| | gtagagacta | taaaattggg | aaaattactt | cggccaaatc | acttgtgggg | ttattatcct | 660 |
| | tttccggatt | gttacaacca | tactataaag | aaaccgggtt | acaatggaag | ttgcttcaat | 720 |
| 40 | gtagaaataa | aaagaaatga | tgatctcagc | tggttgtgga | atgaaagcac | tgctctttac | 780 |
| | ccatccattt | atgtgaacac | 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 |
| 45 | accctcagta | taatgcgaag | tatgaaatct | tgcttgctcc | tagacaatta | catggagact | 1080 |
| | atactgaatc | cttacataat | caacgtcaca | ctagcagcca | aaatgtgtag | ccaagtgtct | 1140 |
| | tgccaggagc | aaggagtgtg | tataaggaaa | aactggaatt | caagtgacta | tcttcacctc | 1200 |
| | aaccagata | atgttgcctat | tcaacttgag | aaaggtggaa | agttcacagt | acgtggaaaa | 1260 |
| | ccgacacttg | aagacctgga | gcaattttct | gaaaaatttt | attgcagctg | ttatagcacc | 1320 |
| 50 | ttgagttgta | aggagaaagc | tgatgtaaaa | gacactgatg | ctggtgatgt | gtgtattgtc | 1380 |
| | gatggtgtct | gtatagatgc | ttttctaaaa | cctcccatgg | agacagaaga | acctcaaatt | 1440 |
| | ttctacaatg | cttcaccctc | cacactatct | gccacaatgt | tcattgttag | tattttgttt | 1500 |
| | cttatcattt | cttctgtagc | gagtttgtaa | | | | 1530 |
- 55 <210> 2
- <211> 1506
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 60 <220>

ES 2 724 588 T3

<223> PH20 con codones optimizados con sitios de restricción

<400> 2

```

5  gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
   ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
   gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
   ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
   tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
   ggaggcattc ctcagaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
10  acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
   cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
   gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
   ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
   cctaaccacc tctgggggcta ttatttggtt cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
15  cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
   ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
   gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggag ccatcagggg gtccaagatc 840
   cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
   gtgttgaagt tctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
20  ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
   ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
   gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
   tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
   ggtggtaaam tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
25  aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
   actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
   ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
   accatgttca tcgtatctat acttttctctg attatatcaa gcgtggcaag cctctgataa 1500
   ggatec                                          1506

```

30

<210> 3

<211> 507

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-507

<400> 3

```

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
45  Phe Leu Thr Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
     35           40           45           50           55           60
   Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65  Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
     65           70           75           80           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
55  Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
     115           120           125           130           135           140
   Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
     145           150           155           160
60  Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn

```

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | |
| | Val | Gln | Leu | Ser | Leu | Thr | Glu | Ala | Thr | Glu | Lys | Ala | Lys | Gln | Glu | Phe | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| 5 | 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 | | | |
| 15 | 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 | | |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | | |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 | | |
| 40 | 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 | | | | | | |
| | | | | 500 | | | | | 505 | | | | | | | | |
| 45 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 505 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Precursor de HuPH20 1-505 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | 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 | |
| 60 | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |

ES 2 724 588 T3

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

60

ES 2 724 588 T3

<210> 5
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-503

<400> 5

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 30
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr

ES 2 724 588 T3

405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 5 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 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

 15 <210> 6
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 20 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-501

 <400> 6
 25 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
 30 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30
 <210> 7
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-499
 <400> 7
 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn

ES 2 724 588 T3

165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 5 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 485 490 495
 Ser Ile Leu

 45
 <210> 8
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-497

 <400> 8
 55 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
 60 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45

ES 2 724 588 T3

Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 485 490 495
 Ser

60

ES 2 724 588 T3

<210> 9
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-495

<400> 9

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 30
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr

ES 2 724 588 T3

405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 5 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 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile
 485 490 495

 <210> 10
 15 <211> 493
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 20 <223> Precursor de HuPH20 1-493

 <400> 10
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 165 170 175
 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
 50 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
 55 245 250 255
 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
 60 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr

ES 2 724 588 T3

290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met
 485 490

<210> 11
 <211> 491
 30 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-491

35 <400> 11
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190

ES 2 724 588 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40
 <210> 12
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-489
 <400> 12
 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
 55 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
 60 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu

ES 2 724 588 T3

5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu
 485

55 <210> 13
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

60 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-490

ES 2 724 588 T3

<400> 13
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460

ES 2 724 588 T3

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

5

<210> 14
<211> 487
<212> PRT
10 <213> *Homo sapiens*

<220>
<223> Precursor de HuPH20 1-487

15 <400> 14
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 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
25 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
30 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
35 145 150 155 160
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
40 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
45 225 230 235 240
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
50 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
55 305 310 315 320
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
60 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn

ES 2 724 588 T3

355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 5 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
 10 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
 15 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

 20 <210> 15
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 25 <220>

 <223> Precursor de HuPH20 1-485

 <400> 15
 30 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
 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | 255 | | | |
| | Thr | Ala | Leu | Tyr | Pro | Ser | Ile | Tyr | Leu | Asn | Thr | Gln | Gln | Ser | Pro | Val |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | 270 | | | |
| 5 | 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 | |
| 10 | 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 | | |
| 15 | 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 | |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | Phe | Tyr | Asn | Ala | Ser | | | | | | | | | | | |
| | | | | 485 | | | | | | | | | | | | |
| 35 | <210> | 16 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 484 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Precursor de HuPH20 1-484 | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | <400> | 16 | | | | | | | | | | | | | | |
| | Met | Gly | Val | Leu | Lys | Phe | Lys | His | Ile | Phe | Phe | Arg | Ser | Phe | Val | Lys |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | | |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | 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 | | |
| 60 | 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 | | | |

ES 2 724 588 T3

Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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

45

<210> 17
 <211> 483
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-483

55 <400> 17
 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
 60 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro

ES 2 724 588 T3

35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe Tyr Asn

60 <210> 18

ES 2 724 588 T3

<211> 482
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-482

<400> 18

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Met | Gly | Val | Leu | Lys | Phe | Lys | His | Ile | Phe | Phe | Arg | Ser | Phe | Val | Lys |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 |
| 40 | 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 | | | |
| 45 | 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 |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | 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 |
| 60 | Asn | Pro | Asp | Asn | Phe | Ala | Ile | Gln | Leu | Glu | Lys | Gly | Gly | Lys | Phe | Thr |
| | | | | 405 | | | | | | 410 | | | | | | 415 |

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10
 <210> 19
 <211> 481
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-481
 20
 <400> 19
 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
 25 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 30 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
 35 100 105 110
 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
 40 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
 45 180 185 190
 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
 50 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
 55 260 265 270
 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
 60 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu

ES 2 724 588 T3

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
 5 340 345 350
 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
 10 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
 15 420 425 430
 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
 20 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe

 25
 <210> 20
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-480

 <400> 20
 35 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
 40 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
 45 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
 50 115 120 125
 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
 55 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
 60 195 200 205

ES 2 724 588 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35
 <210> 21
 <211> 479
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-479
 45 <400> 21
 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
 50 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
 55 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
 60 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys

ES 2 724 588 T3

115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
 465 470 475

<210> 22
 <211> 478
 50 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-478

55 <400> 22
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 60 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30

ES 2 724 588 T3

Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 465 470 475

<210> 23

60 <211> 477

ES 2 724 588 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>

5 <223> Precursor de HuPH20 1-477

<400> 23

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Met | Gly | Val | Leu | Lys | Phe | Lys | His | Ile | Phe | Phe | Arg | Ser | Phe | Val | Lys |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| 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 | | | |
| 15 | 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 | |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 | | |
| 40 | 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 | | | |
| 45 | 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 | |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | 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 | |
| 60 | Val | Arg | Gly | Lys | Pro | Thr | Leu | Glu | Asp | Leu | Glu | Gln | Phe | Ser | Glu | Lys |

ES 2 724 588 T3

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
 5 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu
 465 470 475

 10 <210> 24
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-476

 <400> 24
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20
 <210> 25
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-475
 <400> 25
 30 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
 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser

ES 2 724 588 T3

5 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 245 250 255
 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr
 465 470 475
 <210> 26
 <211> 474
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-474
 40 <400> 26
 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
 45 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
 55 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
 60 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160

ES 2 724 588 T3

Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu
 465 470

<210> 27
 <211> 473
 45 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-473
 50

<400> 27
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 55 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
 60 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg

ES 2 724 588 T3

65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met
 465 470

55 <210> 28
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

60 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-472

ES 2 724 588 T3

<400> 28
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460

ES 2 724 588 T3

Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro
465 470

5 <210> 29
<211> 471
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> Precursor de HuPH20 1-471

<400> 29

15 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

20 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
25 85 90 95

25 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

30 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

35 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

40 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
45 245 250 255

45 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

50 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
55 325 330 335

55 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

60 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln

ES 2 724 588 T3

370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 5 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
 10 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
 15
 <210> 30
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-470
 <400> 30
 25 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
 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25
 <210> 31
 <211> 469
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-469
 35 <400> 31
 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys

ES 2 724 588 T3

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
 5 225 230 235 240
 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 Ile Asp Ala Phe Leu
 465

 <210> 32
 <211> 468
 40 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-468
 45
 <400> 32
 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
 50 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
 55 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
 60 100 105 110

ES 2 724 588 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 Ile Asp Ala Phe
 465

 <210> 33
 50 <211> 467
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 55 <223> Precursor de HuPH20 1-467

 <400> 33
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 60 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys

ES 2 724 588 T3

20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala
 465

60 <210> 34

ES 2 724 588 T3

<211> 466
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-466

<400> 34

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Met | Gly | Val | Leu | Lys | Phe | Lys | His | Ile | Phe | Phe | Arg | Ser | Phe | Val | Lys |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 |
| 40 | 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 | | | |
| 45 | 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 |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | 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 |
| 60 | Asn | Pro | Asp | Asn | Phe | Ala | Ile | Gln | Leu | Glu | Lys | Gly | Gly | Lys | Phe | Thr |
| | | | | 405 | | | | | | 410 | | | | | | 415 |

ES 2 724 588 T3

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
5 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460
Ile Asp
465

10
<210> 35
<211> 465
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15
<220>
<223> Precursor de HuPH20 1-465

<400> 35

20 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
25 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
30 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
35 115 120 125
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
40 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
45 195 200 205
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
50 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
55 275 280 285
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
60 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile

ES 2 724 588 T3

5 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 325 330 335
 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
 10 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
 15 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile
 20 465
 <210> 36
 <211> 464
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-464
 30 <400> 36
 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60

ES 2 724 588 T3

Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30
 <210> 37
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-462
 <400> 37
 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | |
| | Val | Gln | Leu | Ser | Leu | Thr | Glu | Ala | Thr | Glu | Lys | Ala | Lys | Gln | Glu | Phe | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| 5 | 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 | | | |
| 15 | 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 | |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 | | | |
| | | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |
| 40 | <210> | 38 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 460 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Precursor de HuPH20 1-460 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 38 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | Pro | |
| | | 35 | | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| 55 | 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 | |
| 60 | Ile | Asn | Ala | Thr | Gly | Gln | Gly | Val | Thr | Ile | Phe | Tyr | Val | Asp | Arg | Leu | |
| | | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | | 95 | |

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala
 450 455 460

 <210> 39
 50 <211> 458
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 55 <223> Precursor de HuPH20 1-458

 <400> 39
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 60 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | | |
| | Cys | Leu | Thr | Leu | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn | Val | Pro |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | 45 | | | | |
| 5 | 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 | | |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 | |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 | |
| 40 | 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 | | | |
| 45 | 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 | |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | Val | Lys | Asp | Thr | Asp | Ala | Val | Asp | Val | Cys | | | | | | |
| | 450 | | | | | | 455 | | | | | | | | | |

<210> 40

<211> 456

60 <212> PRT

ES 2 724 588 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-456

5

<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 |
| 10 | | | | 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 | | | | |
| 15 | 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 |
| 20 | | | | 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 | | | | |
| 25 | 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 |
| 30 | | | | 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 | | | | |
| 35 | 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 |
| 40 | | | | 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 | | | | |
| 45 | 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 |
| 50 | | | | 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 | | | | |
| 55 | 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 |
| 60 | | | | 420 | | | | | | 425 | | | | | 430 | |

ES 2 724 588 T3

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> 41
 <211> 454
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-454

15 <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

20 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
 25 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

30 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

35 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

40 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

45 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

50 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

55 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

60 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn

ES 2 724 588 T3

355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 5 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
 10 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
 15
 <210> 42
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-452
 <400> 42
 25 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
 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr
 450
 25 <210> 43
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-450
 <400> 43
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | |
| | Tyr | Asn | His | His | Tyr | Lys | Lys | Pro | Gly | Tyr | Asn | Gly | Ser | Cys | Phe | Asn | |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| 5 | 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 | | | |
| 10 | 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 | |
| 15 | | | | | 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 | | | |
| 20 | Val | Thr | Leu | Ala | Ala | Lys | Met | Cys | Ser | Gln | Val | Leu | Cys | Gln | Glu | Gln | |
| | | | | | | | 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 | |
| 25 | | | | | 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 | | | |
| 30 | Val | Lys | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 450 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | 44 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | <211> | 508 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | <223> | Precursor de HuPH20 1-508 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 44 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Met | Gly | Val | Leu | Lys | Phe | Lys | His | Ile | Phe | Phe | Arg | Ser | Phe | Val | Lys | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| 45 | 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 | | |
| 55 | 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 | |
| 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 130 | | | | | | 135 | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 724 588 T3

Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser
 500 505

 <210> 45
 50 <211> 506
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 55 <223> Precursor de HuPH20 1-506

 <400> 45
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 60 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | | |
| | Cys | Leu | Thr | Leu | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn | Val | Pro |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | 45 | | | | |
| 5 | 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 | |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 | |
| 40 | 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 | | | |
| 45 | 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 | |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | 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 | |
| 60 | Ser | Ile | Leu | Phe | Leu | Ile | Ile | Ser | Ser | Val | | | | | | |

ES 2 724 588 T3

500

505

5 <210> 46
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 10 <223> Precursor de HuPH20 1-504

<400> 46
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser
 500

 <210> 47
 20 <211> 502
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 25 <223> Precursor de HuPH20 1-502

 <400> 47
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 30 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 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| | Ala | Ala | Thr | Leu | Tyr | Val | Arg | Asn | Arg | Val | Arg | Glu | Ala | Ile | Arg | Val | |
| | | | | 275 | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| 5 | 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 | | |
| 10 | 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 | | | | |
| 15 | 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 | | |
| 20 | 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 | | | | |
| 25 | 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 | | |
| 30 | Ser | Ile | Leu | Phe | Leu | Ile | | | | | | | | | | | |
| | | | | 500 | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | <210> | 48 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 500 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Precursor de HuPH20 1-500 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | <400> | 48 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Met | Gly | Val | Leu | Lys | Phe | Lys | His | Ile | Phe | Phe | Arg | Ser | Phe | Val | Lys | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | | | |
| 50 | 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 | | | | |
| 55 | 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 | | |
| 60 | 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 | | | | |

ES 2 724 588 T3

Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 Ser Ile Leu Phe
 500
 <210> 49
 50 <211> 498
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 55 <223> Precursor de HuPH20 1-498
 <400> 49
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 60 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | | |
| | Cys | Leu | Thr | Leu | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn | Val | Pro |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | 45 | | | | |
| 5 | 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 | | |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 | |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 | |
| 40 | 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 | | | |
| 45 | 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 | |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | 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 | |
| 60 | Ser | Ile | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 724 588 T3

5 <210> 50
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 10 <223> Precursor de HuPH20 1-496

 <400> 50
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15
 <210> 51
 <211> 494
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-494
 25 <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
 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val

ES 2 724 588 T3

275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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

 30 <210> 52
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 35 <220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-492

 <400> 52
 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
 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
 50 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
 55 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
 60 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175

ES 2 724 588 T3

Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 5 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr
 485 490

<210> 53
 <211> 488
 45 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Precursor de HuPH20 1-488

50 <400> 53
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 55 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
 60 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| | Ile | Asn | Ala | Thr | Gly | Gln | Gly | Val | Thr | Ile | Phe | Tyr | Val | Asp | Arg | Leu |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| 5 | 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 | | | | |
| 10 | 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 |
| 15 | 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 | | | |
| 20 | 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 | |
| 25 | 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 | | | | |
| 30 | 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 | |
| 35 | 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 | | | | |
| 40 | 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 | |
| 45 | 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 | | | | |
| 50 | 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 | | | | | | | | | | | | |
| 55 | <210> 54 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 486 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | <213> <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 724 588 T3

<220>

<223> Precursor de HuPH20 1-486

5 <400> 54
 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp

ES 2 724 588 T3

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
 5 465 470 475 480
 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro
 485

 10 <210> 55
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-507

 <400> 55
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
 325 330 335

ES 2 724 588 T3

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
5 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
10 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
15 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
20
<210> 56
<211> 470
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
25
<220>
<223> HuPH20 madura 36-505
<400> 56
30 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
35 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
40 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
45 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
50 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
55 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
60 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile

ES 2 724 588 T3

245 250 255
 Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
 260 265 270
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 465 470
 30
 <210> 57
 <211> 468
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-503
 40 <400> 57
 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
 45 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
 55 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
 60 145 150 155 160

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 225 230 235 240
 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
 15 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
 20 305 310 315 320
 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
 25 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
 30 385 390 395 400
 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
 35 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
 40 465

<210> 58
 <211> 466
 45 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-501

<400> 58
 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
 55 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
 60 Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro

ES 2 724 588 T3

<400> 59
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
 450 455 460

ES 2 724 588 T3

<210> 60
 <211> 462
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <223> esHuPH20 36-497
 10
 <400> 60
 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20
 <210> 62
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <220>
 <223> esHuPH20 36-493
 <400> 62
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile

ES 2 724 588 T3

245 250 255
 Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
 260 265 270
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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

 30 <210> 63
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 35 <220>
 <223> esHuPH20 36-491

 <400> 63
 40 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
 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
 50 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
 55 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
 60 Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
 165 170 175

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala
 450 455

40 <210> 64
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-489

<400> 64
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 50 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
 55 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
 60 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|---------------------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | 110 | | | | |
| | Glu | Glu | Trp | Arg | Pro | Thr | Trp | Ala | Arg | Asn | Trp | Lys | Pro | Lys | Asp | Val |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| 5 | 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 | |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 | |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 | |
| 40 | 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 | | | |
| 45 | Ala | Ser | Pro | Ser | Thr | Leu | | | | | | | | | | |
| | 450 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | 65 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 455 | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | HuPH20 | madura | 36-490 | | | | | | | | | | | | |
| 55 | <400> | 65 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 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 |
| 60 | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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

55

<210> 66
 <211> 452
 <212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

ES 2 724 588 T3

<220>

<223> HuPH20 madura 36-487

5 <400> 66
 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn

ES 2 724 588 T3

435 440 445
 Ala Ser Pro Ser
 450

5
 <210> 67
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-485

<400> 67

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 20 25 30
 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 20 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
 25 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
 30 115 120 125
 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
 35 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
 40 195 200 205
 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
 45 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
 50 275 280 285
 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
 55 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
 60 355 360 365

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
 435 440 445
 Ala Ser
 450

 15 <210> 68
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 20 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-484

 <400> 68
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp

ES 2 724 588 T3

290 295 300
 Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
 305 310 315 320
 5 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
 10 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
 15 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
 20 Ala

 <210> 69
 25 <211> 448
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 30 <223> HuPH20 madura 36-483

 <400> 69
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
 210 215 220

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30
 <210> 70
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-482
 <400> 70
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg

ES 2 724 588 T3

5 Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
 165 170 175
 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr
 435 440 445

40 <210> 71
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-481

45 <400> 71
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 50 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
 55 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
 60 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
 100 105 110

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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

 45 <210> 72
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 50 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-480

 <400> 72
 55 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
 60 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr

ES 2 724 588 T3

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

<210> 73

<211> 479

<212> PRT

55 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> HuPH20 madura 36-479

60 <400> 73

ES 2 724 588 T3

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

ES 2 724 588 T3

<210> 74
 <211> 443
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-478
 10
 <400> 74
 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| | Ala | Ala | Lys | Met | Cys | Ser | Gln | Val | Leu | Cys | Gln | Glu | Gln | Gly | Val | Cys |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| 5 | 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 |
| | | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | 400 | |
| 10 | 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 | | | | | | |
| 15 | | | 435 | | | | | 440 | | | | | | | | |
| | <210> 76 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 441 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> HuPH20 madura 36-476 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | <400> 76 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Leu | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn | Val | Pro | Phe | Leu | Trp |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| 30 | 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 | | | | |
| 35 | Pro | Tyr | Ile | Asp | Ser | Ile | Thr | Gly | Val | Thr | Val | Asn | Gly | Gly | Ile | Pro |
| | | | | | | 70 | | | | | | 75 | | | 80 | |
| | Gln | Lys | Ile | Ser | Leu | Gln | Asp | His | Leu | Asp | Lys | Ala | Lys | Lys | Asp | Ile |
| | | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | 95 | |
| 40 | 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 | | | | | | 140 | | | |
| 45 | Ser | Leu | Thr | Glu | Ala | Thr | Glu | Lys | Ala | Lys | Gln | Glu | Phe | Glu | Lys | Ala |
| | | | | | | | 145 | | | | | 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 |
| 50 | | | | 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 | | | |
| 55 | Tyr | Pro | Ser | Ile | Tyr | Leu | Asn | Thr | Gln | Gln | Ser | Pro | Val | Ala | Ala | Thr |
| | | | | | | 225 | | | | | | 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 |
| 60 | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | | 270 | |

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 <210> 77
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-475
 <400> 77
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu

ES 2 724 588 T3

210 215 220
 Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
 225 230 235 240
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30
 <210> 78
 <211> 439
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-474
 40 <400> 78
 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
 45 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
 55 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
 60 145 150 155 160

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 225 230 235 240
 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
 15 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
 20 305 310 315 320
 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
 25 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
 30 385 390 395 400
 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
 35 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu
 435

40 <210> 79
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-473

<400> 79
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 50 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
 55 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
 60 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp

ES 2 724 588 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
 5 130 135 140
 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45
 <210> 80
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-472
 <400> 80
 55 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
 60 35 40 45

ES 2 724 588 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 Phe Leu Lys Pro Pro
 435

<210> 81
 <211> 436
 55 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-471

60

ES 2 724 588 T3

<400> 81
 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
 5 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
 10 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
 15 100 105 110
 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
 20 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
 25 180 185 190
 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
 30 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
 35 260 265 270
 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
 40 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
 45 340 345 350
 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
 50 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
 55 420 425 430
 Phe Leu Lys Pro
 435

60 <210> 82

ES 2 724 588 T3

<211> 435
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-470

<400> 82

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Leu | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn | Val | Pro | Phe | Leu | Trp |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 |
| 20 | | | | | 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 | | | |
| 25 | 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 |
| 30 | | | | | 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 | | | |
| 35 | 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 |
| 40 | | | | | 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 | | | |
| 45 | 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 |
| 50 | | | | | 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 | | | |
| 55 | 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 |
| 60 | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |

ES 2 724 588 T3

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> 83
 <211> 434
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-469

15 <400> 83
 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 20 25 30
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp

ES 2 724 588 T3

355 360 365
 Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
 370 375 380
 5 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
 10 Phe Leu

 <210> 84
 15 <211> 433
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 20 <223> HuPH20 madura 36-468

 <400> 84
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
 290 295 300

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
 420 425 430
 Phe

 20
 <210> 85
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-467

 <400> 85
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile

ES 2 724 588 T3

245 250 255
 Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
 260 265 270
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25
 <210> 86
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-466
 <400> 86
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
 195 200 205

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 420 425 430
 30
 <210> 87
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-465
 <400> 87
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg

ES 2 724 588 T3

165 170 175
 Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
 180 185 190
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35
 <210> 88
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-464
 <400> 88
 45 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 50 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
 55 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
 60

ES 2 724 588 T3

Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
 130 135 140
 Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
 145 150 155 160
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40
 <210> 89
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-462
 <400> 89
 50 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
 55 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
 60 Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | |
| | Thr | Phe | Tyr | Met | Pro | Val | Asp | Asn | Leu | Gly | Met | Ala | Val | Ile | Asp | Trp | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| 5 | 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 | | |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 | |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | | |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 | | |
| 40 | 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 | | | | | | | | |
| 45 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | | | | | | | | 90 | | | | | | | | |
| | <211> | | | | | | | | 425 | | | | | | | | |
| | <212> | | | | | | | | PRT | | | | | | | | |
| | <213> | | | | | | | | <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | | | | | | | | HuPH20 | | | | | | | | 36-460 |
| | <400> | | | | | | | | 90 | | | | | | | | |
| 55 | 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 | |
| 60 | | | 35 | | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |

ES 2 724 588 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50
 <210> 91
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-458
 60
 <400> 91

ES 2 724 588 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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

55

<210> 92

<211> 421

<212> PRT

60

<213> *Homo sapiens*

ES 2 724 588 T3

<220>

<223> HuPH20 madura 36-456

5 <400> 92

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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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

60

ES 2 724 588 T3

<210> 93
 <211> 419
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-454

10 <400> 93
 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 145 150 155 160
 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
 35 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
 40 225 230 235 240
 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
 45 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
 50 305 310 315 320
 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
 55 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
 60 385 390 395 400

ES 2 724 588 T3

Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
 405 410 415
 Thr Asp Ala

5

<210> 94
 <211> 417
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> HuPH20 madura 36-452

15 <400> 94
 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 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
 25 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
 30 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
 35 145 150 155 160
 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
 40 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
 45 225 230 235 240
 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
 50 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
 55 305 310 315 320
 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
 60 Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp

ES 2 724 588 T3

355 360 365
 Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
 370 375 380
 5 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
 10
 <210> 95
 <211> 415
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-450
 20 <400> 95
 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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

 15 <210> 96
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 20 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-508

 <400> 96
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 165 170 175
 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
 50 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
 55 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
 60 Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp

ES 2 724 588 T3

290 295 300
 Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
 305 310 315 320
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25
 <210> 97
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-506
 <400> 97
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
 195 200 205

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35
 <210> 98
 <211> 469
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-504
 45 <400> 98
 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
 50 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
 55 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
 60 Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val

ES 2 724 588 T3

115 120 125
 Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
 130 135 140
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 Phe Leu Ile Ile Ser
 465

 <210> 99
 <211> 467
 50 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-502
 55
 <400> 99
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 60 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 Phe Leu Ile
 465

<210> 100

60 <211> 465

ES 2 724 588 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

5 <223> HuPH20 madura 36-500

<400> 100

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

10 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30

Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 35 40 45

15 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

20 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

25 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

30 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

35 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

40 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

45 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

50 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

55 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

60 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala

ES 2 724 588 T3

420 425 430
 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
 435 440 445
 5 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
 450 455 460
 Phe
 465
 10
 <210> 101
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-498
 <400> 101
 20 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
 25 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
 30 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
 35 115 120 125
 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
 40 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
 45 195 200 205
 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
 50 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
 55 275 280 285
 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
 60 Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu

ES 2 724 588 T3

5 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
 10 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
 15 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile
 450 455 460

 20 <210> 102
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 25 <220>
 <223> esHuPH20 36-496

 <400> 102
 30 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 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
 40 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
 45 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
 50 165 170 175
 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
 55 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
 60 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
 245 250 255

ES 2 724 588 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 450 455 460

 <210> 103
 30 <211> 459
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 35 <223> esHuPH20 36-494

 <400> 103
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 40 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
 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
 50 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
 55 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
 60 Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His

ES 2 724 588 T3

180 185 190
 His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
 195 200 205
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe
 450 455

<210> 104
 <211> 457
 40 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <223> esHuPH20 36-492
 45

<400> 104
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 50 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
 55 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
 60 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
 100 105 110

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45
 <210> 105
 <211> 453
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> HuPH20 madura 36-488
 55 <400> 105
 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

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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

55

<210> 106

<211> 451

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

ES 2 724 588 T3

<220>

<223> HuPH20 madura 36-486

5 <400> 106
 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20
 <210> 108
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <220>
 <223> PH20 humana madura 36-509
 <400> 108
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile

ES 2 724 588 T3

245 250 255
 Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
 260 265 270
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30
 <210> 109
 <211> 482
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> RHuPH20 precursora 1-482
 40 <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
 45 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
 55 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
 60 145 150 155 160

ES 2 724 588 T3

Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe Tyr

45 <210> 110
 <211> 1446
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>
 <223> ADN que codifica para rHuPH20 precursora soluble

<400> 110
 atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
 55 tcccagatag ttttcacctt cctttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
 cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcttc tgggcctgga atgcccccaag tgaattttgt 180
 cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccgga 240
 ataaacgccca cggggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
 tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttctcta 360
 60 caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatctt atatgccagt agacaatttg 420

ES 2 724 588 T3

```

ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccaactgagaa agcaaaaaca gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatcct 660
5 tttccggatt gttacaacca tcaactataag aaaccogggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
10 cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
15 ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatctt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac 1446

20 <210> 111
    <211> 553
    <212> PRT
    <213> Bos taurus

25 <220>
    <223> PH20 bovina

    <400> 111
30 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
35 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
40 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
45 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
50 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
55 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
60 Asp Val Glu Lys Arg Arg Asn Asp Asp Leu Glu Trp Leu Trp Lys Glu

```

ES 2 724 588 T3

5 Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asn Ile Arg Leu Lys Ser
 245 250 255
 260 265 270
 Thr Gln Asn Ala Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Gln Glu Ala Ile
 275 280 285
 Arg Leu Ser Lys Ile Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val
 290 295 300
 Tyr Ala Arg Pro Val Phe Thr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ser Gln
 305 310 315 320
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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

40
 <210> 112
 <211> 545
 <212> PRT
 45 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<220>
 <223> PH20 de conejo
 50
 <400> 112
 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
 55 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
 60 Gly Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Leu Phe Gly Ser Pro Arg

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| | Lys | Asn | Lys | Thr | Gly | Gln | Gly | Ile | Thr | Ile | Phe | Tyr | Val | Asp | Arg | Leu |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| 5 | 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 | | | | |
| 10 | 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 |
| 15 | | | | 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 | | | | |
| 20 | 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 |
| 25 | | | | 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 | | | | |
| 30 | 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 |
| 35 | | | | 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 | | | | |
| 40 | 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 |
| 45 | | | | 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 | | | | |
| 50 | 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 |
| 55 | | | | 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 | | | |
| 60 | Lys | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 724 588 T3

545

5 <210> 113
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*

<220>
 10 <223> PH20 de oveja (parcial)

<400> 113
 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Leu Ser Lys Ile
 1 5 10 15
 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
 20 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
 25 Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
 100 105 110
 Ile Arg

30 <210> 114
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

35 <220>
 <223> PH20 de mono cynomolgus

<400> 114
 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
 45 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
 50 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
 55 115 120 125
 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
 60 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn

ES 2 724 588 T3

5 Val Gln Leu Ser Leu Pro Gln Ala Thr Asp Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 165 170 175
 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
 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 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45
 <210> 115
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> *Cavia porcellus*
 50
 <220>
 <223> PH20 de cobaya
 <400> 115
 55 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 Pro Leu Ile Pro Asn Val Pro Leu
 35 40 45
 60

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 Val His Asn Val Arg Ser Val Asn Val Cys Thr Ala Asn Asn Ile Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Val Leu Asn Phe Pro Ser Leu Asp Asp Asp Asp Glu Pro
 465 470 475 480
 55 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
 60 Trp Cys Leu Phe Leu Leu Ser Ile Phe Ser Gln His Trp Lys Tyr Leu
 515 520 525

ES 2 724 588 T3

Leu

5 <210> 116
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

10 <220>
 <223> PH20 de rata

<400> 116

15 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
 20 Phe Val Trp Val Trp Asn Val Pro Thr Glu Ala Cys Val Glu Asn Val
 50 55 60
 Thr Glu Pro Ile Asp Leu Ser Phe Phe Ser Leu Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Lys Thr Ala Ile Gly Gln Pro Val Thr Leu Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 25 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
 30 Asp Val Glu Arg Tyr Ile Pro Thr Asp Lys Leu Gly Leu Ala Ile Ile
 130 135 140
 Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Met Arg Asn Trp Thr Pro Lys
 145 150 155 160
 35 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
 40 Ile Arg Pro Lys His Leu Trp Gly Phe Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr
 210 215 220
 Asn Asn Lys Phe Gln Val Asp Asn Tyr Asp Gly Gln Cys Pro Asp Val
 225 230 235 240
 Glu Lys Lys Arg Asn Asp Asp Leu Asp Trp Leu Trp Lys Glu Ser Thr
 245 250 255
 45 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
 50 Ser Lys Val Ser Asp Glu Ser Asn Pro Val Pro Ile Phe Val Tyr Ile
 290 295 300
 Arg Leu Val Phe Thr Asp His Val Ser Glu Tyr Leu Leu Glu Asp Asp
 305 310 315 320
 Leu Val Asn Thr Ile Gly Glu Ile Val Ala Gln Gly Thr Ser Gly Ile
 325 330 335
 55 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
 60 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Thr Leu Cys Lys Glu Lys

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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

 35 <210> 118
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*

 40 <220>
 <223> PH20 de oveja

 <400> 118
 45 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
 50 Thr Gly Gln Phe Ile Thr Leu Phe Tyr Ala Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro His Ile Asp Glu Lys Thr Gly Asn Thr Val Tyr Gly Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 55 Gln Leu Gly Asn Leu Lys Asn His Leu Glu Lys Ala Lys Lys Asp Ile
 85 90 95
 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
 60 Tyr Arg Asp Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Gln Lys Asn Pro Gln Leu

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 130 | | | | | 135 | | | | | | 140 | | | | | |
| | Ser | Phe | Pro | Glu | Ala | Ser | Lys | Ile | Ala | Lys | Val | Asp | Phe | Glu | Thr | Ala | |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| 5 | 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 | | | | |
| 10 | 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 | |
| 15 | 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 | | | | |
| 20 | 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 | |
| 25 | 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 | | | | |
| 30 | 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 | |
| 35 | 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 | | | | |
| 40 | 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 | |
| 45 | 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 | | | | | | | | | |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | 119 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 474 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | <213> | <i>Bos taurus</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | PH20 de vaca | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | <400> | 119 | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Met | Gly | Met | Phe | 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 | | |
| 5 | 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 | | | | |
| 10 | 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 | |
| 15 | Gly | Gly | Ile | Pro | Gln | Leu | Gly | Asn | Leu | Lys | Ser | His | Leu | 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 | | | |
| 20 | 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 | | |
| 25 | 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 | | | | |
| 30 | 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 | 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 | | |
| 35 | 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 | | | | |
| 40 | 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 | Val | Gln | Ser |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| 45 | 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 | | | | |
| 50 | Asp | Gly | 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 | Leu | Thr | Leu | Glu | Asp | Leu | Gln | Lys | Phe | Ser |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| 55 | Asp | Thr | Phe | Tyr | Cys | Ser | Cys | Tyr | Ser | Asn | Leu | Ser | Cys | Lys | Lys | Arg |
| | | | | 435 | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| | Val | Asp | Ile | Lys | Asn | Val | His | Ser | Val | Asp | Val | Cys | Met | Ala | Glu | Asp |
| | | | | 450 | | | 455 | | | | | 460 | | | | |
| 60 | Val | Cys | Ile | Asp | Ala | Phe | Leu | Lys | Pro | Pro | | | | | | |
| | 465 | | | | | | 470 | | | | | | | | | |

ES 2 724 588 T3

<210> 120
 <211> 517
 5 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*

 <220>
 <223> PH20 de oveja (Halozyme)
 10
 <400> 120
 Asp Phe Arg Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser Phe Leu Trp Ala
 1 5 10 15
 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Lys Val Thr Leu Glu Asp Leu Gln Thr Phe Ser Asp Lys Phe Tyr Cys

ES 2 724 588 T3

385 390 395 400
 Ser Cys Tyr Ala Asn Ile Asn Cys Lys Lys Arg Val Asp Ile Lys Asn
 405 410 415
 5 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
 10 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
 15 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

20 <210> 121
 <211> 1620
 <212> ADN
 <213> *Ovis aries*

25 <220>
 <223> ADN que codifica para PH20 de oveja en SEQ ID NO: 118

<400> 121
 30 ttttccgtgt tggttggetc tggacttcag agcaccctct ctcatttcaa acatttcttt 60
 cctctggggc tggaaatgcc cagctgaacg ttgtattaaa atctttaaac tacctccaga 120
 tctgagactc ttctctgtaa aaggaagccc ccaaaaaagt gctacgggac aatttattac 180
 attattttat gctgatagac ttggctacta tctcatata gatgaaaaa caggcaacac 240
 tgtatatgga ggaattcccc agttgggaaa cttaaaaaat catttgaaa aagccaaaa 300
 agacattgcc tattacatac caaatgacag cgtgggcttg gcggtcattg actgggaaaa 360
 35 ctggaggcct acctgggcaa gaaactggaa acctaaagat gtttacaggg atgagtctgt 420
 tgagttgggt ctgcaaaaaa atccacaact cagtttccca gaggcttcca agattgcaaa 480
 agtggatttt gagacagcag gaaagagttt catgcaagag actttaaaac tgggaaaatt 540
 acttcggcca aatcacttat ggggttatta tctttttcct gattgttaca atcataatta 600
 taaccagcct acttacaatg gaaattgctc tgatttagaa aaaaggagaa atgatgatct 660
 40 cgactgggtt tggaggaaa gcaactgcct tttcccttct gtttatttga atatcaagt 720
 aaaatctact ccaaaagctg ctttctatgt tcgtaatcgt gtccaggaag ccattcgggt 780
 gtctaaaata gcgagtgttg aaagtccact tcccgttttt gtatatcacc gtccagtttt 840
 tactgatggg tcttcaacat acctttctca gggtgacctt gtgaattcgg ttgggtgagat 900
 cgttgtctta ggtgcctctg ggattataat gtggggcagt ctcaatctaa gcctaactat 960
 45 gcaatcttgc atgaacctag gcaattactt gaacactaca ctgaatcctt acataatcaa 1020
 cgtcacccta gcagccaaaa tgtgcagcca agtgccttgc cacgatgaag gagtgtgtac 1080
 aaggaaaca tggaaattcaa ggcactatct tcacctgaac ccaatgaatt ttgctattca 1140
 aactgggaaa ggtggaaaat acacagtacc tgggaaagtc aacttgaag acctgcaaac 1200
 gttttctgat aaattttatt gcagttgtta tgccaacatc aactgtaaga agagagttga 1260
 50 tataaaaaat gttcatagtg ttaatgtatg tatggcagaa gacatttgta tagagggcc 1320
 tgtgaagtta caaccagtg atcattctct tagccagaat gaggcatcta ctaccaccgt 1380
 cagcagatc tcaccctcta ctacagccac cacagtatct ccatgtactc ctgagaaaca 1440
 gtcccctgag tgcctcaaag tcaggtgttt ggaagccatc gccaacgtca cccaaacggg 1500
 gtgtcaaggt gttaaattgga agaacacttc cagtcagtca agtattcaaa atattaaaaa 1560
 55 tcaaacaacc tattaaaata taaattcagt gcttataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620

<210> 122
 <211> 447
 60 <212> PRT

ES 2 724 588 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> rHuPH20 soluble 36-482

5

<400> 122

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Leu | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn | Val | Pro | Phe | Leu | Trp |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| 10 | Ala | Trp | Asn | Ala | Pro | Ser | Glu | Phe | Cys | Leu | Gly | Lys | Phe | Asp | Glu | Pro |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | |
| | Leu | Asp | Met | Ser | Leu | Phe | Ser | Phe | Ile | Gly | Ser | Pro | Arg | Ile | Asn | Ala |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | | 45 | | | |
| | Thr | Gly | Gln | Gly | Val | Thr | Ile | Phe | Tyr | Val | Asp | Arg | Leu | Gly | Tyr | Tyr |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| 15 | 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 | |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | 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 | | | | |
| 35 | 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 | |
| 40 | 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 | | | |
| 45 | 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 | |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | 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 | |
| 60 | Thr | Asp | Ala | Val | Asp | Val | Cys | Ile | Ala | Asp | Gly | Val | Cys | Ile | Asp | Ala |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | | 430 | |

ES 2 724 588 T3

Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr
 435 440 445

5 <210> 123
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> rHuPH20 soluble 36-481
 <400> 123

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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
 435 440 445

 <210> 124
 <211> 445
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <223> rHuPH20 soluble 36-480
 20
 <400> 124
 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp

ES 2 724 588 T3

305 310 315 320
 Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
 325 330 335
 5 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
 10 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
 15 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

 20 <210> 125
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 25 <220>
 <223> rHuPH20 soluble 36-479

 <400> 125
 30 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 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
 40 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
 45 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
 50 165 170 175
 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
 55 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
 60 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
 245 250 255

ES 2 724 588 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25
 <210> 126
 <211> 443
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> rHuPH20 soluble 36-478
 35 <400> 126
 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile

ES 2 724 588 T3

195 200 205
 Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
 210 215 220
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 435 440

 <210> 127
 35 <211> 442
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 40 <223> rHuPH20 soluble 36-477

 <400> 127
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
 130 135 140

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40
 <210> 128
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <220>
 <223> Precursor de sHuPH20 1-467
 <400> 128
 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 Pro
 35 40 45
 55 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
 60 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu

ES 2 724 588 T3

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

ES 2 724 588 T3

<210> 130
 <211> 478
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <223> Precursor de sHuPH20 1-478
 10
 <400> 130
 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu

ES 2 724 588 T3

385 390 395 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405 410 415
5 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
10 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
465 470 475

<210> 131
15 <211> 479
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
20 <223> Precursor de sHuPH20 1-479

<400> 131
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
25 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
30 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
35 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
40 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
45 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
50 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
55 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
60 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 <210> 132
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <220>
 <223> Precursor de sHuPH20 1-480
 <400> 132
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| | Tyr | Asn | His | His | Tyr | Lys | Lys | Pro | Gly | Tyr | Asn | Gly | Ser | Cys | Phe | Asn |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| 5 | 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 | | | |
| 10 | 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 |
| 15 | | | | | 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 | | | |
| 20 | 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 |
| 25 | | | | | 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 | | | |
| 30 | 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 |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | 133 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 481 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | <i>Homo sapiens</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Precursor de sHuPH20 1-481 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 133 | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 |
| 50 | | | 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 |
| 55 | 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 |
| 60 | | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | |

ES 2 724 588 T3

Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 Phe

 <210> 134
 50 <211> 483
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 55 <223> Precursor de sHuPH20 1-483

 <400> 134
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 60 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | | |
| | Cys | Leu | Thr | Leu | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn | Val | Pro |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | 45 | | | | |
| 5 | 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 | |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 | |
| 40 | 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 | | | |
| 45 | 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 | |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | 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 | | | | | | | | | | | | | |

60

ES 2 724 588 T3

<210> 135
 <211> 432
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> sHuPH20 madura 36-467

10 <400> 135
 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 145 150 155 160
 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
 35 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
 40 225 230 235 240
 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
 45 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
 50 305 310 315 320
 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
 55 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
 60 385 390 395 400

ES 2 724 588 T3

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

5

<210> 136
 <211> 448
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> sHuPH20 madura 36-483

15 <400> 136
 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 20 25 30
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp

ES 2 724 588 T3

355 360 365
 Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
 370 375 380
 5 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
 10 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
 435 440 445

 <210> 137
 15 <211> 509
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 20 <223> Variante de PH20 precursora P48A

 <400> 137
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 25 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
 30 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
 35 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
 40 130 135 140
 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
 45 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
 50 210 215 220
 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
 55 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
 60 290 295 300

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
 500 505

30 <210> 138
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <223> Variante de PH20 precursora L499W

<400> 138
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 40 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
 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
 50 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
 55 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
 60 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe

ES 2 724 588 T3

180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 Ser Ile Trp Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
 500 505

45 <210> 139
 <211> 1449
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>
 <223> Secuencia de ARNm de Gen2

<400> 139
 atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
 tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
 55 cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcttc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
 cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccgga 240
 ataaacgccca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
 tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
 caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
 60 ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480

ES 2 724 588 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
5 gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgccttttac 780
ccatccattht atttgaacac tcagcagctct 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
10 accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag tcaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatthttct gaaaaatthtt attgcagctg ttatagcacc 1320
15 ttgagttgta aggagaaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactga

```

<210> 140
20 <211> 6630
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Vector HZ24

<400> 140

```

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgtttg atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
30 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcc cccctattg acgtcaatga 420
35 cggtaaatgg cccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttacgggact ttctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcgggtttt ggcagtacac 540
caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataacc 660
cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720
40 tcgthttagtg aaccgtcaga tcaactagaag cthttattgag gtagthttatc acagthtaaat 780
tgctaacgca gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagthggtc 840
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gthtaaggag accaatagaa 900
actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgthttctga taggcacctt ttggctctac 960
tgacatccac thtgcccttc tctccacagg tgtccactcc cagthtcaatt acagctctta 1020
45 aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcatg ggagtgctaa aattcaagca 1080
catctthttc agaagctthg thaaatcaag tggagtatcc cagatagtht tcaccttctt 1140
tctgattcca tgttgcttga ctctgaatth cagagcacct cctgthattc caaatgtgcc 1200
thtctctctg gcctggaatg ccccaagtga atthttgtctt ggaaaatthg atgagccact 1260
agatatgagc ctcttctctt tcataggaag ccccccgaata aacgccaccg ggcaagggtg 1320
50 tacaatatht tatgthtgata gactthggta ctactthtac atagattcaa tcacaggagt 1380
aactgtgaat ggaggaatcc cccagaagt thctthtaca gaccatctgg acaagctaa 1440
gaaagacatt acatthtata tgccagtaga caatthggga atggctgtha ttgactggga 1500
agaatggaga cccacttggg caagaaactg gaaocctaaa gatgthttaca agaataggtc 1560
tattgaattg gthtcagcaac aaaatgtaca acttagtctc acagaggcca ctgagaaaagc 1620
55 aaaacaagaa thtgaaaagg cagggaagga thtctctggta gagactataa aatthgggaaa 1680
attacttctg ccaaatcact tgtggggtht thattctthtt ccggattgth acaacctatca 1740
ctataagaaa cccggttaca atggaagthg ctthcaatgta gaaataaaaa gaaatgatga 1800
tctcagctgg thgtggaatg aaagcactgc ththttacca thcattthatt tgaacactca 1860
gcagthctct gtagctgcta cactctatgt gcgcaatcga gthtcgggaag ccacagagt 1920
60 thccaaaata cctgatgcaa aaagtccact thccgththtt gcataatccc gcatagththt 1980

```

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | |
|----|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|------|
| | tactgatcaa | gttttgaaat | tcctttctca | agatgaactt | gtgtatacat | ttggcgaaac | 2040 |
| | tgttgctctg | ggtgcttctg | gaattgtaat | atggggaacc | ctcagtataa | tgcgaaagtat | 2100 |
| | gaaatcttgc | ttgctcctag | acaattacat | ggagactata | ctgaatcctt | acataatcaa | 2160 |
| | cgtcacacta | gcagccaaaa | tgtgtagcca | agtgctttgc | caggagcaag | gagtgtgtat | 2220 |
| 5 | aaggaaaaac | tggaattcaa | gtgactatct | tcacctcaac | ccagataatt | ttgctattca | 2280 |
| | acttgagaaa | ggtggaaagt | tcacagtaag | tggaaaaccg | acacttgaag | acctggagca | 2340 |
| | atthttctgaa | aaatthttatt | gcagctgtta | tagcaccttg | agttgtaagg | agaaagctga | 2400 |
| | tgtaaaaagac | actgatgctg | ttgatgtgtg | tattgctgat | ggtgtctgta | tagatgcttt | 2460 |
| | tctaaaacct | cccatggaga | cagaagaacc | tcaaattttc | tactgaggat | ccatagctaa | 2520 |
| 10 | cgccccctctc | cctccccccc | ccctaacggt | actggccgaa | gccgcttggg | ataaggccgg | 2580 |
| | tgtgctgtttg | tctatatggt | atthttccacc | atattgcccgt | ctthttggcaa | tgtgagggcc | 2640 |
| | cggaaacctg | gccctgtctt | cttgacgagc | attcctaggg | gtctthtccc | tctcgccaaa | 2700 |
| | ggaatgcaag | gtctgttgaa | tgtcgtgaa | gaagcagttc | ctctggaagc | ttcttgaaga | 2760 |
| | caaacaacgt | ctgtagcgac | cctthtgcagg | cagcggaaac | ccccacctgg | cgacaggtgc | 2820 |
| 15 | ctctgctggcc | aaaagccacg | tgtataagat | acacctgcaa | aggcggcaca | accccagtgc | 2880 |
| | cacgtttgtga | gthtggatagt | tgtggaaaga | gtcaaattggc | tctcctcaag | cgtattcaac | 2940 |
| | aaggggctga | aggatggcca | gaaggtacc | cattgtatgg | gatctgatct | ggggcctcgg | 3000 |
| | tgcacatgct | ttacatgtgt | ttagtcgagg | ttaaaaaaac | gtctaggccc | cccgaaccac | 3060 |
| | ggggacgtgg | thttccttht | aaaaacacga | tgataagctt | gccacaaccc | acagcggccg | 3120 |
| 20 | ctgccatcat | gthtgcacca | ttgaaactgca | tcgtcgcctg | gtcccaaaat | atgggggattg | 3180 |
| | gcaagaacgg | agacctacc | tggcctccgc | tcaggaacga | gthtcaagtac | ttccaaagaa | 3240 |
| | tgaccacaac | ctcttcagtg | gaaggtaaac | agaatctggt | gattatgggt | aggaaaacct | 3300 |
| | gthtctccat | tcctgagaag | aatcgacctt | taaaggacag | aattaatata | gthtctcagta | 3360 |
| | gagaactcaa | agaaccacca | cgaggagctc | atthttcttgc | caaaagtht | gatgatgcct | 3420 |
| 25 | taagacttat | tgaacaaccg | gaattggcaa | gtaaagtaga | catggttht | atagtcggag | 3480 |
| | gcagthtctgt | ttaccaggaa | gccatgaatc | aaccaggcca | cctcagactc | thtgtgacaa | 3540 |
| | ggatcatgca | ggaathtggaa | agtgacacgt | thttcccaga | aattgatttg | gggaaatata | 3600 |
| | aactthtccc | agaataccca | ggcgtcctct | ctgaggthtca | ggaggaaaaa | ggcatcaagt | 3660 |
| | ataagthtga | agthtctacgag | aagaaagact | aaacgcgtgg | tacctctaga | gtcgaccctgg | 3720 |
| 30 | gcggccgctt | cgagcagaca | tgataagata | cattgatgag | thtggacaaa | ccacaactag | 3780 |
| | aatgcagtg | aaaaaatgct | thattthtgtga | aathtthtgtat | gctattgctt | tathtthtgaac | 3840 |
| | cattataagc | tgcaataaac | aagthtaacaa | caacaattgc | atthtatttht | tgthtthtcaggt | 3900 |
| | tcagggggag | atgtgggag | thttthtaaac | caagthtaaac | ctctacaaat | tgthtthtaaac | 3960 |
| | cgataaggt | ccgggctggc | gtaatagcga | agagggccgc | accgatcgcc | ctthtccaca | 4020 |
| 35 | gthtgcgagc | ctgaaatggcg | aatggacgcg | ccctgtagcg | gcgcattaag | cgcgccgggt | 4080 |
| | gtggtggtht | cgcgacgctg | gaccgctaca | cttgccagcg | ccctagcgcc | cgctccttht | 4140 |
| | gctthtctcc | ctthtcttht | cgccacgtht | gcccgttht | cccgtcaagc | tctaaatcgg | 4200 |
| | gggctccctt | taggthtccg | atthtagtgc | ttacggcacc | tcgaccccaa | aaaacttgat | 4260 |
| | tagggtgatg | gthtccagtg | tgggcatcg | ccctgataga | cggtthttht | ccctthtgacg | 4320 |
| 40 | thtggagtcca | cgthtcttht | tagtggactc | thtthtccaaa | ctggaacaac | actcaacct | 4380 |
| | atctcggtht | atthtctthtga | thtataaggg | atthtthtccga | thtthtggccta | thtggthtaaaa | 4440 |
| | aatgagctga | thtthtaaaaa | atthtaacgcg | aaththtaaca | aatattaac | gctthtacaatt | 4500 |
| | tcctgatgcg | gtathtthtctc | cttacgcctc | tgtgcccgtat | thtcaaccgc | atatggtgca | 4560 |
| | ctctcagtac | aatctgctct | gatgcccgat | agthtaagcca | gccccgacac | ccgccaacac | 4620 |
| 45 | ccgctgacgc | gccctgacgg | gctthtctg | thtcccgcctc | cgctthtcaaga | caagctgtga | 4680 |
| | ccgthtccgg | gagctgcatg | tgthtcaaggt | thtthtaccgtht | atthtaccgaaa | cgcgccgagac | 4740 |
| | gaaagggcct | cgtgatacgc | ctathttht | aggthtaagt | catgataata | atggtthtctt | 4800 |
| | agacgtcagg | tggcacttht | cggggaaatg | tgcgccggaac | ccctathttht | thtathtthtct | 4860 |
| | aaatacattc | aaatatgtat | ccgctcatga | gacaataacc | ctgataaatg | ctthtcaataat | 4920 |
| 50 | atthtaaaaag | gaagagtatg | agthtthtcaac | atthtthtccgtg | cgcccttht | ccctthtthttht | 4980 |
| | cggcatttht | cctthtctgtht | thtthtctcacc | cagaaaccgt | ggthtaagta | aaagatgctg | 5040 |
| | aagatcagtht | gggtgaccca | gtgggtthtaca | tcgaaactgga | tctcaacagc | ggtaagatcc | 5100 |
| | thttagagtht | tcgccccgaa | gaacgthttht | caatgatgag | cactthttht | gthtctgctat | 5160 |
| | gtggcgcgg | atthtctccgt | atthtgcgcg | ggcaagagca | actcggthtgc | cgcatacact | 5220 |
| 55 | atthtctcagaa | tgactthtggtht | gagthtctcac | cagthtcaaga | aaagcatctt | acggatggca | 5280 |
| | tgacagtaag | agaattatgc | agthtctgcca | thtaaccatgag | tgataaacact | gcccgaact | 5340 |
| | tactthtctgac | aacgatcggg | ggaccgaagg | agthtaaccgc | thtthtthtgcac | aacatggggg | 5400 |
| | atcatgtaac | tcgcttht | cgthtgggaa | cgagctgaa | tgaaagccata | ccaaacgacg | 5460 |
| | agcgtgacac | cacgatgcct | gtagcaatgg | caacaaccgtt | gcgcaacta | thtaactggcg | 5520 |
| 60 | aactacttac | tctagcttht | cggaacaat | thtaagactg | gatggaggcg | gataaagtht | 5580 |

ES 2 724 588 T3

caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggtt tattgctgat aaatctggag 5640
 ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5700
 gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5760
 tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
 5 atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
 tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5940
 accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 6000
 gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttg tttgccggat caagagctac 6060
 caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actggtcttc 6120
 10 tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
 ctctgctaatt cctgttaccg gtggctgctg ccagtgggcga taagtcgtgt cttaccgggt 6240
 tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 6300
 gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
 tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatccg gtaagcggca 6420
 15 gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
 gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
 ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctctg gccttttgct 6600
 ggccttttgc tcacatggct cgacagatct 6630

20

<210> 141

<211> 186

<212> PRT

25 <213> *Mus musculus*

<220>

<223> dihidrofolato reductasa

30 <400> 141

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

35 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

40 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

45 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

50 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

55

<210> 142

<211> 6

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

ES 2 724 588 T3

<220>
 <223> Etiqueta de Hexa His

5 <400> 142
 His His His His His His
 1 5

10 <210> 143
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Etiqueta Flag

<400> 143
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 20 1 5

<210> 144
 <211> 22
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Péptido señal de IgK humana

30 <400> 144
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Ala Arg Gly
 35 20

<210> 145
 <211> 21
 40 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <223> Péptido señal de IgK de ratón

45 <400> 145
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp
 50 20

<210> 146
 <211> 1500
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-SSVA con los sitios de restricción
 60 NheI y BamHI

ES 2 724 588 T3

<400> 146
 5 gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg ccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 10 cctacttggg ccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc ccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 15 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaa ccatcagggt gtccaagatc 840
 cccgatgcca aatctcccct ccagtggtt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 20 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 25 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
 accatgttca tcgtatctat acttttctctg attatatcaa gcgtggcatg ataaggatcc 1500

30 <210> 147
 <211> 1494
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-IISS con los sitios de restricción
 NheI y BamHI

<400> 147
 40 gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg ccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 45 ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg ccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 50 cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc ccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaa ccatcagggt gtccaagatc 840
 cccgatgcca aatctcccct ccagtggtt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 55 gtgttgaagt tctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 60 ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260

ES 2 724 588 T3

```

aagtttctact gttagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgtc 1440
accatgttca tcgtatctat acttttctctg attatatcaa gctgataagg atcc 1494
5
<210> 148
<211> 1488
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> ADN de SPAM1-FLII con codones optimizados con los sitios de restricción
NheI y BamHI
15
<400> 148
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtggggc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
20
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcaaaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca cggaaaaagc taagcaggaa 540
25
ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctgggggcta ttatttggtc ccgattgctt acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggag ccatcagggt gtccaagatc 840
30
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtataact ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgtttg ataactacat ggagacaatc ctgaacctat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
35
tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcaactgtccg aggggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagtttctact gttagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgtc 1440
40
accatgttca tcgtatctat acttttctctg attatatgat aaggatcc 1488

<210> 149
<211> 1482
45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-ILFL con los sitios de restricción
NheI y BamHI
50
<400> 149
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtggggc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
55
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcaaaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
60
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480

```

ES 2 724 588 T3

gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatgtgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 5 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggag ccatcagggt gtccaagatc 840
 cccgatgccca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 gtggttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 10 ctgctggttg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 15 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
 accatgttca tcgtatctat acttttccctg tgataaggat cc 1482

20 <210> 150

<211> 1476

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-VSIL con los sitios de restricción
 NheI y BamHI

<400> 150

gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctggtgggccc ttcttctgct ttggctccct 60
 30 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggggt gacaatcttt 240
 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactgggggt gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctacagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 35 acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatgtgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggag ccatcagggt gtccaagatc 840
 cccgatgccca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 gtggttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 45 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctggttg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 50 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
 accatgttca tcgtatctat actttgataa ggatcc 1476

55 <210> 151

<211> 1470

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

ES 2 724 588 T3

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-FIVS con los sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 151

```

5  gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtggggc ttcttctgct ttggctccct 60
   ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
   gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
   ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
   tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
10  ggaggcattc ctcagaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
   acattctaca tgccagtggg caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
   cctacttggg cccgaaattg gaagcccagg gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
   gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
   ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
15  cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
   cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
   ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
   gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggag ccatcagggt gtccaagatc 840
   cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
20  gtgttgaagt tctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
   ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
   ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
   gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
   tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
25  ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
   aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
   actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
   ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
   accatgttca tcgtatcttg ataaggatcc                                     1470

```

<210> 152

<211> 1464

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> ADN con codones optimizados SPAM1-TMFI con los sitios de restricción NheI y BamHI

40 <400> 152

```

   gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtggggc ttcttctgct ttggctccct 60
   ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
   gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
   ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
45  tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
   ggaggcattc ctcagaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
   acattctaca tgccagtggg caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
   cctacttggg cccgaaattg gaagcccagg gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
   gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
50  ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
   cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
   cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
   ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
   gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggag ccatcagggt gtccaagatc 840
55  cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
   gtgttgaagt tctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
   ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
   ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
   gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
60  tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200

```

ES 2 724 588 T3

```

ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc acaactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagtttact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
5 accatgttca tctgataagg atcc 1464

```

```

<210> 153
<211> 1458
<212> ADN

```

10 <213> Secuencia artificial

```

<220>
<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-SATM con los sitios de restricción
NheI y BamHI

```

```

15 <400> 153
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
20 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcaaaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
25 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaaag ctgggaagga ttctctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatataat tcaacacaca gcagtcccca 780
30 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtataact ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacctat atatcattaa cgtgactttg 1080
35 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc acaactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagtttact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
40 ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
accatgtgat aaggatcc 1458

```

```

<210> 154
<211> 1452
<212> ADN

```

45 <213> Secuencia artificial

```

<220>
<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-TLSA con los sitios de restricción
NheI y BamHI

```

```

50 <400> 154
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
55 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcaaaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
60 cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480

```

ES 2 724 588 T3

```

gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatgtgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
5 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
gtggttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
10 ctgctggttg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcgaggg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagtttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
15 actgatgccc ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
tgataaggat cc 1452

<210> 155
20 <211> 1446
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-PSTL con los sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 155
30 gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtggggc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctacagaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
35 acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatgtgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
40 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
gtggttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
45 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctggttg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcgaggg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
50 aagtttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccc ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgtgataa 1440
ggatcc 1446

55 <210> 156
<211> 1440
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>

```

ES 2 724 588 T3

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-ASPS con los sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 156

```

5  gctagcatgg  acatgaggggt  accagcccag  ctggttgggcc  ttcttctgct  ttggctccct  60
   ggggcaaggg  gacttaactt  cagagctccc  cctgtaatcc  caaacgtccc  cttcctgtgg  120
   gcatggaacg  cccctagcga  attctgtttg  gggaaatttg  acgaacctct  ggacatgtct  180
   ctgttttctt  ttatcggtag  ccctcgaatc  aacgctaccg  gacagggggg  gacaatcttt  240
   tacgtggatc  gtctgggcta  ttacccttac  atcgacagca  ttactggggg  gaccgtgaac  300
10  ggaggcattc  ctcagaaaaa  atcactgcag  gaccacctgg  acaaagctaa  gaaggatatt  360
   acattctaca  tgccagtgga  caatctcgga  atggctgtga  ttgactggga  ggagtggaga  420
   cctacttggg  cccgaaattg  gaagcccaag  gatgtgtata  agaaccgatc  cattgagctg  480
   gtgcagcagc  agaacgtgca  gctgtccctt  acagaagcca  ccgaaaaagc  taagcaggaa  540
   ttcgagaaaag  ctgggaagga  tttcctgggt  gagacaataa  aacttgggaa  actgcttaga  600
15  cctaaccacc  tctggggcta  ttatttggtc  cccgattgct  acaatcacca  ctataagaag  660
   cccggctaca  acggatcttg  tttcaacgtc  gaaattaaaa  gaaacgatga  cctctcttgg  720
   ttgtggaatg  agtctactgc  actctacccc  tctatatatc  tcaacacaca  gcagtcccca  780
   gtagccgcta  ccctctacgt  tcggaataga  gtgaggggag  ccatcagggt  gtccaagatc  840
   cccgatgcca  aatctcccct  cccagtgttt  gcctacacca  ggatcgtggt  taccgaccag  900
20  gtgttgaagt  tcctgagcca  ggacgagctc  gtgtatactt  ttggcgagac  agttgctctg  960
   ggagcctctg  ggatcgtgat  ctggggcact  ctgagtatta  tgcgatcaat  gaagtcctgc  1020
   ctgctgttgg  ataactacat  ggagacaatc  ctgaaccat  atatcattaa  cgtgactttg  1080
   gccgctaaga  tgtgttcaca  ggtgctgtgt  caagagcagg  gagtatgcat  taggaagaac  1140
   tggaactcaa  gcgattatct  ccatctgaac  ccagataatt  ttgcaatcca  gctggaaaag  1200
25  ggtggtaaat  tcactgtccg  agggaagccc  acactcgagg  atctcgaaca  gtttagtgaa  1260
   aagttctact  gtagctgcta  tagcactctg  agttgtaagg  aaaaagccga  tgtgaaagac  1320
   actgatgccg  ttgacgtttg  catcgccgat  ggggtgtgta  ttgacgcctt  tctcaagcca  1380
   ccaatggaga  ctgaggagcc  ccagatcttt  tacaacgcct  ccccctcctg  ataaggatcc  1440

```

30

<210> 157

<211> 1434

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-YNAS con los sitios de restricción NheI y BamHI

40 <400> 157

```

40  gctagcatgg  acatgaggggt  accagcccag  ctggttgggcc  ttcttctgct  ttggctccct  60
   ggggcaaggg  gacttaactt  cagagctccc  cctgtaatcc  caaacgtccc  cttcctgtgg  120
   gcatggaacg  cccctagcga  attctgtttg  gggaaatttg  acgaacctct  ggacatgtct  180
   ctgttttctt  ttatcggtag  ccctcgaatc  aacgctaccg  gacagggggg  gacaatcttt  240
45  tacgtggatc  gtctgggcta  ttacccttac  atcgacagca  ttactggggg  gaccgtgaac  300
   ggaggcattc  ctcagaaaaa  atcactgcag  gaccacctgg  acaaagctaa  gaaggatatt  360
   acattctaca  tgccagtgga  caatctcgga  atggctgtga  ttgactggga  ggagtggaga  420
   cctacttggg  cccgaaattg  gaagcccaag  gatgtgtata  agaaccgatc  cattgagctg  480
   gtgcagcagc  agaacgtgca  gctgtccctt  acagaagcca  ccgaaaaagc  taagcaggaa  540
50  ttcgagaaaag  ctgggaagga  tttcctgggt  gagacaataa  aacttgggaa  actgcttaga  600
   cctaaccacc  tctggggcta  ttatttggtc  cccgattgct  acaatcacca  ctataagaag  660
   cccggctaca  acggatcttg  tttcaacgtc  gaaattaaaa  gaaacgatga  cctctcttgg  720
   ttgtggaatg  agtctactgc  actctacccc  tctatatatc  tcaacacaca  gcagtcccca  780
   gtagccgcta  ccctctacgt  tcggaataga  gtgaggggag  ccatcagggt  gtccaagatc  840
55  cccgatgcca  aatctcccct  cccagtgttt  gcctacacca  ggatcgtggt  taccgaccag  900
   gtgttgaagt  tcctgagcca  ggacgagctc  gtgtatactt  ttggcgagac  agttgctctg  960
   ggagcctctg  ggatcgtgat  ctggggcact  ctgagtatta  tgcgatcaat  gaagtcctgc  1020
   ctgctgttgg  ataactacat  ggagacaatc  ctgaaccat  atatcattaa  cgtgactttg  1080
   gccgctaaga  tgtgttcaca  ggtgctgtgt  caagagcagg  gagtatgcat  taggaagaac  1140
60  tggaactcaa  gcgattatct  ccatctgaac  ccagataatt  ttgcaatcca  gctggaaaag  1200

```


ES 2 724 588 T3

```

ggtggtaaat tcaactgtccg aggggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagtttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cctgataagg atcc 1434
5
<210> 158
<211> 1431
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-FYNA con los sitios de restricción
NheI y BamHI
15
<400> 158
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
20
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcaaaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtggg caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
25
ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc ccgattgctt acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggag ccatcagggt gtccaagatc 840
30
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtataact ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgtttg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
35
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcaactgtccg aggggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagtttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct gataaggatc c 1431
40
<210> 159
<211> 1428
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
45
<220>
<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-IFYN con los sitios de restricción
NheI y BamHI
50
<400> 159
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
55
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcaaaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtggg caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
60
ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600

```

ES 2 724 588 T3

```

cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggag ccatcagggt gtccaagatc 840
5 cccgatgcc aatctcccct cccagtgttt gcttacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
gtggttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
10 tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaa at tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcaactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaactgat aaggatcc 1428
15
<210> 160
<211> 1425
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20
<220>
<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-QIFY con los sitios de restricción
NheI y BamHI
25
<400> 160
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtggggc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
30 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaagc taagcaggaa 540
35 ttcgagaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggag ccatcagggt gtccaagatc 840
40 cccgatgcc aatctcccct cccagtgttt gcttacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
gtggttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
45 tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaa at tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcaactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tactgataag gatcc 1425
50
<210> 161
<211> 1422
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55
<220>
<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-PQIF con los sitios de restricción
NheI y BamHI
60
<400> 161

```

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | |
|----|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 25 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 30 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 35 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 40 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 45 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 50 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 55 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 60 | | | | | | | |

ES 2 724 588 T3

<210> 163
 <211> 1416
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-EEPQ con los sitios de restricción
 NheI y BamHI

10 <400> 163
 gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 15 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 20 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaa ccatcagggt gtccaagatc 840
 25 cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccocat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 30 tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200

 ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 35 ccaatggaga ctgaggagcc ccagtgataa ggatcc 1416

<210> 164
 <211> 1413
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-TEEP con los sitios de restricción
 NheI y BamHI

45 <400> 164
 gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 50 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 55 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 60 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaa ccatcagggt gtccaagatc 840

ES 2 724 588 T3

cccgatgccca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcaact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 5 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaatt tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 10 ccaatggaga ctgaggagcc ctgataagga tcc 1413

<210> 165
 <211> 1410
 <212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-ETEE con los sitios de restricción
 NheI y BamHI

20 <400> 165

gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggtccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 25 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcagaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtggg caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg cccgaaattg gaagcccagg gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 30 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtcccct acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgct gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatac tcaacacaca gcagtcccca 780
 35 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggag ccatcagggt gtccaagatc 840
 cccgatgccca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcaact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 40 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaatt tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 45 ccaatggaga ctgaggagtg ataaggatcc 1410

<210> 166
 <211> 1407
 <212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-METE con los sitios de restricción
 NheI y BamHI

55 <400> 166

gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggtccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 60 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240

ES 2 724 588 T3

5
 10
 15
 20

| | | | | | | |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactgggggt | gaccgtgaac | 300 |
| ggaggcattc | ctcagaaaaat | atcactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| acattctaca | tgccagtggga | caatctcggga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| cctacttggg | cccgaattg | gaagcccaag | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccctt | acagaagcca | ccgaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| ttcgagaaaag | ctgggaagga | tttcctgggt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| cctaaccacc | tctggggcta | ttatttgttc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatatatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| gtagccgcta | ccctctacgt | tcggaataga | gtgaggggaag | ccatcaggggt | gtccaagatc | 840 |
| cccgatgcca | aatctcccct | cccagtgttt | gcctacacca | ggatcgtggt | taccgaccag | 900 |
| gtggtgaagt | tcttgagcca | ggacgagctc | gtgtatactt | ttggcgagac | agttgctctg | 960 |
| ggagcctctg | ggatcgtgat | ctggggcact | ctgagtatta | tgcatcaat | gaagtcctgc | 1020 |
| ctgctgttgg | ataactacat | ggagacaatc | ctgaacccat | atatcattaa | cgtgactttg | 1080 |
| 15 gccgctaaga | tgtgttcaca | ggtgctgtgt | caagagcagg | gagtatgcat | taggaagaac | 1140 |
| tggaactcaa | gcgattatct | ccatctgaac | ccagataatt | ttgcaatcca | gctggaaaag | 1200 |
| ggtggtaaat | tactgtccg | agggaaagccc | acactcgagg | atctcgaaca | gtttagttaa | 1260 |
| aagttctact | gtagctgcta | tagcactctg | agttgtaagg | aaaaagccga | tgtgaaagac | 1320 |
| actgatgccg | ttgacgtttg | catcgccgat | gggggtgtgta | ttgacgcctt | tctcaagcca | 1380 |
| 20 ccaatggaga | ctgagtgata | aggatcc | | | | 1407 |

<210> 167

<211> 1404

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-PMET con los sitios de restricción NheI y BamHI

30

<400> 167

35
 40
 45
 50
 55

| | | | | | | |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| gctagcatgg | acatgaggggt | accagcccag | ctgttggggc | ttcttctgct | ttggctccct | 60 |
| ggggcaaggg | gacttaactt | cagagctccc | cctgtaatcc | caaacgtccc | cttctgtggt | 120 |
| gcatggaacg | cccctagcga | attctgtttg | gggaaatttg | acgaacctct | ggacatgtct | 180 |
| 35 ctgttttctt | ttatcggtag | ccctcgaatc | aacgctaccg | gacaggggggt | gacaatcttt | 240 |
| tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactgggggt | gaccgtgaac | 300 |
| ggaggcattc | ctcagaaaaat | atcactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| acattctaca | tgccagtggga | caatctcggga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| cctacttggg | cccgaattg | gaagcccaag | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| 40 gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccctt | acagaagcca | ccgaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| ttcgagaaaag | ctgggaagga | tttcctgggt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| cctaaccacc | tctggggcta | ttatttgttc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatatatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| 45 gtagccgcta | ccctctacgt | tcggaataga | gtgaggggaag | ccatcaggggt | gtccaagatc | 840 |
| cccgatgcca | aatctcccct | cccagtgttt | gcctacacca | ggatcgtggt | taccgaccag | 900 |
| gtggtgaagt | tcttgagcca | ggacgagctc | gtgtatactt | ttggcgagac | agttgctctg | 960 |
| ggagcctctg | ggatcgtgat | ctggggcact | ctgagtatta | tgcatcaat | gaagtcctgc | 1020 |
| ctgctgttgg | ataactacat | ggagacaatc | ctgaacccat | atatcattaa | cgtgactttg | 1080 |
| 50 gccgctaaga | tgtgttcaca | ggtgctgtgt | caagagcagg | gagtatgcat | taggaagaac | 1140 |
| tggaactcaa | gcgattatct | ccatctgaac | ccagataatt | ttgcaatcca | gctggaaaag | 1200 |
| ggtggtaaat | tactgtccg | agggaaagccc | acactcgagg | atctcgaaca | gtttagttaa | 1260 |
| aagttctact | gtagctgcta | tagcactctg | agttgtaagg | aaaaagccga | tgtgaaagac | 1320 |
| actgatgccg | ttgacgtttg | catcgccgat | gggggtgtgta | ttgacgcctt | tctcaagcca | 1380 |
| 55 ccaatggaga | cttgataaag | atcc | | | | 1404 |

<210> 168

<211> 1401

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

ES 2 724 588 T3

<220>

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-PPME con los sitios de restricción
NheI y BamHI

5

<400> 168

| | | | | | | | |
|----|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| | gctagcatgg | acatgagggt | accagcccag | ctggtgggcc | ttcttctgct | ttggctccct | 60 |
| | ggggcaaggg | gacttaactt | cagagctccc | cctgtaatcc | caaacgtccc | cttcctgtgg | 120 |
| | gcatggaacg | cccctagcga | attctgtttg | gggaaatttg | acgaacctct | ggacatgtct | 180 |
| 10 | ctgttttctt | ttatcggtag | ccctcgaatc | aacgctaccg | gacagggggg | gacaatcttt | 240 |
| | tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactggggg | gaccgtgaac | 300 |
| | ggaggcattc | ctcagaaaa | atcaactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| | acattctaca | tgccagtgga | caatctcgga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| | cctacttggg | cccgaattg | gaagcccaag | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| 15 | gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccctt | acagaagcca | ccgaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| | ttcgagaaag | ctgggaagga | tttctgggtt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| | cctaaccacc | tctggggcta | ttatttggtc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| | cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| | ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatatatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| 20 | gtagccgcta | ccctctacgt | tcggaataga | gtgaggggag | ccatcagggt | gtccaagatc | 840 |
| | cccgatgcca | aatctcccct | cccagtgttt | gcctacacca | ggatcgtggt | taccgaccag | 900 |
| | gtgttgaagt | tcttgagcca | ggacgagctc | gtgtataactt | ttggcgagac | agttgctctg | 960 |
| | ggagcctctg | ggatcgtgat | ctggggcact | ctgagtatta | tgcgatcaat | gaagtcctgc | 1020 |
| | ctgctgttgg | ataactacat | ggagacaatc | ctgaaccat | atatcattaa | cgtgactttg | 1080 |
| 25 | gccgctaaga | tgtgttcaca | ggtgctgtgt | caagagcagg | gagtatgcat | taggaagaac | 1140 |
| | tggaactcaa | gcgattatct | ccatctgaac | ccagataatt | ttgcaatcca | gctggaaaag | 1200 |
| | ggtggtaaat | tcaactgtccg | aggggaagccc | acactcgagg | atctcgaaca | gtttagttaa | 1260 |
| | aagttctact | gtagctgcta | tagcactctg | agttgtaagg | aaaaagccga | tgtgaaagac | 1320 |
| | actgatgccg | ttgacgtttg | catcgccgat | gggggtgtgta | ttgacgcctt | tctcaagcca | 1380 |
| 30 | ccaatggagt | gataaggatc | c | | | | 1401 |

<210> 169

<211> 1398

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-KPPM con los sitios de restricción
NheI y BamHI

40

<400> 169

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| | gctagcatgg | acatgagggt | accagcccag | ctggtgggcc | ttcttctgct | ttggctccct | 60 |
| | ggggcaaggg | gacttaactt | cagagctccc | cctgtaatcc | caaacgtccc | cttcctgtgg | 120 |
| | gcatggaacg | cccctagcga | attctgtttg | gggaaatttg | acgaacctct | ggacatgtct | 180 |
| 45 | ctgttttctt | ttatcggtag | ccctcgaatc | aacgctaccg | gacagggggg | gacaatcttt | 240 |
| | tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactggggg | gaccgtgaac | 300 |
| | ggaggcattc | ctcagaaaa | atcaactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| | acattctaca | tgccagtgga | caatctcgga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| | cctacttggg | cccgaattg | gaagcccaag | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| 50 | gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccctt | acagaagcca | ccgaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| | ttcgagaaag | ctgggaagga | tttctgggtt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| | cctaaccacc | tctggggcta | ttatttggtc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| | cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| | ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatatatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| 55 | gtagccgcta | ccctctacgt | tcggaataga | gtgaggggag | ccatcagggt | gtccaagatc | 840 |
| | cccgatgcca | aatctcccct | cccagtgttt | gcctacacca | ggatcgtggt | taccgaccag | 900 |
| | gtgttgaagt | tcttgagcca | ggacgagctc | gtgtataactt | ttggcgagac | agttgctctg | 960 |
| | ggagcctctg | ggatcgtgat | ctggggcact | ctgagtatta | tgcgatcaat | gaagtcctgc | 1020 |
| | ctgctgttgg | ataactacat | ggagacaatc | ctgaaccat | atatcattaa | cgtgactttg | 1080 |
| 60 | gccgctaaga | tgtgttcaca | ggtgctgtgt | caagagcagg | gagtatgcat | taggaagaac | 1140 |

ES 2 724 588 T3

```

tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagtttact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
5 ccaatgtgat aaggatcc 1398

```

<210> 170
 <211> 1395
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-LKPP con los sitios de restricción
 NheI y BamHI

```

15 <400> 170
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctgttggggc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
20 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
25 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
30 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
35 ctgctgtttg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagtttact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
40 ccatgataag gatcc 1395

```

<210> 171
 <211> 1392
 <212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-FLKP con los sitios de restricción
 NheI y BamHI

```

50 <400> 171
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctgttggggc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
55 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
60 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540

```


ES 2 724 588 T3

ttcgagaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatttggtt cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 5 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggag ccatcagggt gtccaagatc 840
 cccgatgcc aatctcccct cccagtgttt gcttacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccocat atatcattaa cgtgactttg 1080
 10 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 15 tgataaggat cc 1392

<210> 172

<211> 1389

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-AFLK con los sitios de restricción
NheI y BamHI

25

<400> 172

gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtggggc ttcttctgct ttggctccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 30 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcaaaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctactttgg cccgaaattg gaagcccagg gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 35 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtcccct acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 ttcgagaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatttggtt cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 40 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggag ccatcagggt gtccaagatc 840
 cccgatgcc aatctcccct cccagtgttt gcttacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccocat atatcattaa cgtgactttg 1080
 45 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagtga 1380
 50 taagatcc 1389

<210> 173

<211> 1386

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-DAFL con los sitios de restricción
NheI y BamHI

60

ES 2 724 588 T3

<400> 173
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
5 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcaaaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
10 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
15 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
gtggtgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtataact ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
20 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
25 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctctgataa 1380
gcatcc 1386

<210> 174
<211> 1383
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-IDAF con los sitios de restricción
35 NheI y BamHI

<400> 174
gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
40 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcaaaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
45 cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
50 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
gtggtgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtataact ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
55 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
60 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt ttgataagga 1380

ES 2 724 588 T3

tcc

1383

<210> 175
<211> 1380

5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-CIDA con los sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 175

| | | | | | | | |
|----|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| | gctagcatgg | acatgagggt | accagcccag | ctgttgggcc | ttcttctgct | ttggctccct | 60 |
| | ggggcaaggg | gacttaactt | cagagctccc | cctgtaatcc | caaacgtccc | cttcctgtgg | 120 |
| 15 | gcatggaacg | cccctagcga | attctgtttg | gggaaatttg | acgaacctct | ggacatgtct | 180 |
| | ctgttttctt | ttatcggtag | ccctcgaatc | aacgctaccg | gacagggggg | gacaatcttt | 240 |
| | tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactggggg | gaccgtgaac | 300 |
| | ggaggcattc | ctcagaaaat | atcactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| | acattctaca | tgccagtggg | caatctcgga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| 20 | cctacttggg | cccgaaattg | gaagcccagg | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| | gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccctt | acagaagcca | ccgaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| | ttcgagaaaag | ctgggaagga | tttctgtggt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| | cctaaccacc | tctggggcta | ttatttggtc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| | cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| 25 | ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatatatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| | gtagccgcta | ccctctacgt | tcggaataga | gtgaggggag | ccatcagggt | gtccaagatc | 840 |
| | cccgatgcca | aatctcccct | cccagtgttt | gcctacacca | ggatcgtggt | taccgaccag | 900 |
| | gtgttgaagt | tcctgagcca | ggacgagctc | gtgtataact | ttggcgagac | agttgctctg | 960 |
| 30 | ggagcctctg | ggatcgtgat | ctggggcact | ctgagtatta | tgcgatcaat | gaagtcctgc | 1020 |
| | ctgctgttgg | ataactacat | ggagacaatc | ctgaacccat | atatcattaa | cgtgactttg | 1080 |
| | gccgctaaga | tgtgttcaca | ggtgctgtgt | caagagcagg | gagtatgcat | taggaagaac | 1140 |
| | tggaaactcaa | gcgattatct | ccatctgaac | ccagataatt | ttgcaatcca | gctggaaaag | 1200 |
| | ggtggtaaat | tcactgtccg | agggagccc | acactcgagg | atctcgaaca | gttagtgtaa | 1260 |
| 35 | aagttctact | gtagctgcta | tagcactctg | agttgtaagg | aaaaagccga | tgtgaaagac | 1320 |
| | actgatgccg | ttgacgtttg | catcgccgat | gggggtgtgta | ttgacgcctg | ataaggatcc | 1380 |

<210> 176
<211> 1377

40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-VCID con los sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 176

| | | | | | | | |
|----|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| | gctagcatgg | acatgagggt | accagcccag | ctgttgggcc | ttcttctgct | ttggctccct | 60 |
| | ggggcaaggg | gacttaactt | cagagctccc | cctgtaatcc | caaacgtccc | cttcctgtgg | 120 |
| 50 | gcatggaacg | cccctagcga | attctgtttg | gggaaatttg | acgaacctct | ggacatgtct | 180 |
| | ctgttttctt | ttatcggtag | ccctcgaatc | aacgctaccg | gacagggggg | gacaatcttt | 240 |
| | tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactggggg | gaccgtgaac | 300 |
| | ggaggcattc | ctcagaaaat | atcactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| | acattctaca | tgccagtggg | caatctcgga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| 55 | cctacttggg | cccgaaattg | gaagcccagg | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| | gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccctt | acagaagcca | ccgaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| | ttcgagaaaag | ctgggaagga | tttctgtggt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| | cctaaccacc | tctggggcta | ttatttggtc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| 60 | cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |

ES 2 724 588 T3

ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
 cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 5 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaatt tcaactgtccg aggggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 10 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgactgata aggatcc 1377

<210> 177

<211> 1374

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-GVCI con los sitios de restricción
 NheI y BamHI

<400> 177

gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 25 gcatggaacg ccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggggt gacaatcttt 240
 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactgggggt gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcagaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtgga caatctcggga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 30 cctacttggg cccgaaattg gaagcccgaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctgggggcta ttatttgctc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg ttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 35 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
 cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 40 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaatt tcaactgtccg aggggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 45 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta tttgataagg atcc 1374

<210> 178

<211> 1371

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-DGVC con los sitios de restricción
 NheI y BamHI

<400> 178

gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 60 gcatggaacg ccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggggt gacaatcttt 240

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | |
|----|-------------|---|--------------|-------------|-------------|------------|------|
| | tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactgggggt | gaccgtgaac | 300 |
| | ggaggcattc | ctcagaaaaat | atcactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| | acattctaca | tgccagtgga | caatctcgga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| | cctacttggg | cccgaaattg | gaagcccaag | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| 5 | gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccctt | acagaagcca | ccgaaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| | ttcgagaaaag | ctgggaagga | tttctctggt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| | cctaaccacc | tctgggggcta | ttatctgttc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| | cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| | ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatatatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| 10 | gtagccgcta | ccctctacgt | tcggaataga | gtgaggggaag | ccatcagggg | gtccaagatc | 840 |
| | cccgatgcca | aatctcccct | cccagtgttt | gcctacacca | ggatcgtggt | taccgaccag | 900 |
| | gtgttgaagt | tcttgagcca | ggacgagctc | gtgtataact | ttggcgagac | agttgctctg | 960 |
| | ggagcctctg | ggatcgtgat | ctgggggcaact | ctgagtatta | tgcgatcaat | gaagtcctgc | 1020 |
| | ctgctgttgg | ataactacat | ggagacaatc | ctgaacccat | atatcattaa | cgtgactttg | 1080 |
| 15 | gccgctaaga | tgtgttcaca | ggtgctgtgt | caagagcagg | gagtatgcat | taggaagaac | 1140 |
| | tggaactcaa | gcgattatct | ccatctgaac | ccagataatt | ttgcaatcca | gctggaaaag | 1200 |
| | ggtggtaaat | tactgtccg | agggaaagccc | acactcgagg | atctcgaaca | gtttagtgaa | 1260 |
| | aagttctact | gtagctgcta | tagcactctg | agttgtaagg | aaaaagccga | tgtgaaagac | 1320 |
| | actgatgccg | ttgacgtttg | catcgccgat | ggggtgtggt | gataaggatc | c | 1371 |
| 20 | <210> | 179 | | | | | |
| | <211> | 1365 | | | | | |
| | <212> | ADN | | | | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | | | | |
| 25 | <220> | | | | | | |
| | <223> | ADN con codones optimizados de SPAM1-IADG con los sitios de restricción | | | | | |
| | | NheI y BamHI | | | | | |
| 30 | <400> | 179 | | | | | |
| | gctagcatgg | acatgagggg | accagcccag | ctgttggggc | ttcttctgct | ttggctccct | 60 |
| | ggggcaaggg | gacttaactt | cagagctccc | cctgtaatcc | caaacgtccc | cttctctgtg | 120 |
| | gcatggaacg | cccctagcga | attctgtttg | gggaaatttg | acgaacctct | ggacatgtct | 180 |
| | ctgttttctt | ttatcggtag | ccctcgaatc | aacgctaccg | gacagggggg | gacaactttt | 240 |
| 35 | tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactgggggt | gaccgtgaac | 300 |
| | ggaggcattc | ctcagaaaaat | atcactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| | acattctaca | tgccagtgga | caatctcgga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| | cctacttggg | cccgaaattg | gaagcccaag | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| | gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccctt | acagaagcca | ccgaaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| 40 | ttcgagaaaag | ctgggaagga | tttctctggt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| | cctaaccacc | tctgggggcta | ttatctgttc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| | cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| | ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatatatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| | gtagccgcta | ccctctacgt | tcggaataga | gtgaggggaag | ccatcagggg | gtccaagatc | 840 |
| 45 | cccgatgcca | aatctcccct | cccagtgttt | gcctacacca | ggatcgtggt | taccgaccag | 900 |
| | gtgttgaagt | tcttgagcca | ggacgagctc | gtgtataact | ttggcgagac | agttgctctg | 960 |
| | ggagcctctg | ggatcgtgat | ctgggggcaact | ctgagtatta | tgcgatcaat | gaagtcctgc | 1020 |
| | ctgctgttgg | ataactacat | ggagacaatc | ctgaacccat | atatcattaa | cgtgactttg | 1080 |
| | gccgctaaga | tgtgttcaca | ggtgctgtgt | caagagcagg | gagtatgcat | taggaagaac | 1140 |
| 50 | tggaactcaa | gcgattatct | ccatctgaac | ccagataatt | ttgcaatcca | gctggaaaag | 1200 |
| | ggtggtaaat | tactgtccg | agggaaagccc | acactcgagg | atctcgaaca | gtttagtgaa | 1260 |
| | aagttctact | gtagctgcta | tagcactctg | agttgtaagg | aaaaagccga | tgtgaaagac | 1320 |
| | actgatgccg | ttgacgtttg | catcgccgat | gggtgataag | gatcc | | 1365 |
| 55 | <210> | 180 | | | | | |
| | <211> | 1359 | | | | | |
| | <212> | ADN | | | | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | | | | |
| 60 | <220> | | | | | | |

ES 2 724 588 T3

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-VCIA con los sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 180

```

5  gctagcatgg  acatgagggg  accagcccag  ctggtggggc  ttcttctgct  ttggtccct  60
   ggggcaaggg  gacttaactt  cagagctccc  cctgtaatcc  caaacgtccc  cttcctgtgg  120
   gcatggaacg  cccctagcga  attctgtttg  gggaaatttg  acgaacctct  ggacatgtct  180
   ctgttttctt  ttatcggtag  ccctcgaatc  aacgctaccg  gacagggggg  gacaatcttt  240
   tacgtggatc  gtctgggcta  ttacccttac  atcgacagca  ttactggggg  gaccgtgaac  300
10  ggaggcattc  ctcagaaaat  atcactgcag  gaccacctgg  acaaagctaa  gaaggatatt  360
   acattctaca  tgccagtgga  caatctcgga  atggctgtga  ttgactggga  ggagtggaga  420
   cctacttggg  cccgaaattg  gaagcccaag  gatgtgtata  agaaccgatc  cattgagctg  480
   gtgcagcagc  agaacgtgca  gctgtccctt  acagaagcca  ccgaaaaagc  taagcaggaa  540
   ttcgagaaaag  ctgggaagga  tttcctgggt  gagacaataa  aacttgggaa  actgcttaga  600
15  cctaaccacc  tctggggcta  ttatttggtc  cccgattgct  acaatcacca  ctataagaag  660
   cccggctaca  acggatcttg  tttcaacgtc  gaaattaaaa  gaaacgatga  cctctcttgg  720
   ttgtggaatg  agtctactgc  actctacccc  tctatatatc  tcaacacaca  gcagtcccc  780
   gtagccgcta  ccctctacgt  tcggaataga  gtgaggggag  ccatcagggt  gtccaagatc  840
   cccgatgcca  aatctcccct  cccagtgttt  goctacacca  ggatcgtggt  taccgaccag  900
20  gtgttgaagt  tcctgagcca  ggacgagctc  gtgtatactt  ttggcgagac  agttgctctg  960
   ggagcctctg  ggatcgtgat  ctggggcact  ctgagtatta  tgcgatcaat  gaagtcctgc  1020
   ctgctgttgg  ataactacat  ggagacaatc  ctgaaccat  atatcattaa  cgtgactttg  1080
   gccgctaaga  tgtgttcaca  ggtgctgtgt  caagagcagg  gagtatgcat  taggaagaac  1140
   tggaactcaa  gcgattatct  ccatctgaac  ccagataatt  ttgcaatcca  gctggaaaag  1200
25  ggtggtaaat  tcaactgtcc  agggaagccc  acactcgagg  atctcgaaca  gtttagtgaa  1260
   aagttctact  gtagctgcta  tagcactctg  agttgtaagg  aaaaagccga  tgtgaaagac  1320
   actgatgccg  ttgacgtttg  catcgctctg  taaggatcc  1359

```

<210> 181

30 <211> 1353

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-VDVC con los sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 181

```

40  gctagcatgg  acatgagggg  accagcccag  ctggtggggc  ttcttctgct  ttggtccct  60
   ggggcaaggg  gacttaactt  cagagctccc  cctgtaatcc  caaacgtccc  cttcctgtgg  120
   gcatggaacg  cccctagcga  attctgtttg  gggaaatttg  acgaacctct  ggacatgtct  180
   ctgttttctt  ttatcggtag  ccctcgaatc  aacgctaccg  gacagggggg  gacaatcttt  240
   tacgtggatc  gtctgggcta  ttacccttac  atcgacagca  ttactggggg  gaccgtgaac  300
   ggaggcattc  ctcagaaaat  atcactgcag  gaccacctgg  acaaagctaa  gaaggatatt  360
45  acattctaca  tgccagtgga  caatctcgga  atggctgtga  ttgactggga  ggagtggaga  420
   cctacttggg  cccgaaattg  gaagcccaag  gatgtgtata  agaaccgatc  cattgagctg  480
   gtgcagcagc  agaacgtgca  gctgtccctt  acagaagcca  ccgaaaaagc  taagcaggaa  540
   ttcgagaaaag  ctgggaagga  tttcctgggt  gagacaataa  aacttgggaa  actgcttaga  600
   cctaaccacc  tctggggcta  ttatttggtc  cccgattgct  acaatcacca  ctataagaag  660
50  cccggctaca  acggatcttg  tttcaacgtc  gaaattaaaa  gaaacgatga  cctctcttgg  720
   ttgtggaatg  agtctactgc  actctacccc  tctatatatc  tcaacacaca  gcagtcccc  780
   gtagccgcta  ccctctacgt  tcggaataga  gtgaggggag  ccatcagggt  gtccaagatc  840
   cccgatgcca  aatctcccct  cccagtgttt  goctacacca  ggatcgtggt  taccgaccag  900
   gtgttgaagt  tcctgagcca  ggacgagctc  gtgtatactt  ttggcgagac  agttgctctg  960
55  ggagcctctg  ggatcgtgat  ctggggcact  ctgagtatta  tgcgatcaat  gaagtcctgc  1020
   ctgctgttgg  ataactacat  ggagacaatc  ctgaaccat  atatcattaa  cgtgactttg  1080
   gccgctaaga  tgtgttcaca  ggtgctgtgt  caagagcagg  gagtatgcat  taggaagaac  1140
   tggaactcaa  gcgattatct  ccatctgaac  ccagataatt  ttgcaatcca  gctggaaaag  1200
   ggtggtaaat  tcaactgtcc  agggaagccc  acactcgagg  atctcgaaca  gtttagtgaa  1260
60  aagttctact  gtagctgcta  tagcactctg  agttgtaagg  aaaaagccga  tgtgaaagac  1320

```

ES 2 724 588 T3

actgatgccg ttgacgtttg ctgataagga tcc 1353

<210> 182
<211> 1347

5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-DAVD con los sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 182

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| | gctagcatgg | acatgagggt | accagcccag | ctgttgggcc | ttcttctgct | ttggctccct | 60 |
| | ggggcaaggg | gacttaactt | cagagctccc | cctgtaatcc | caaacgtccc | cttcctgtgg | 120 |
| 15 | gcatggaacg | cccctagcga | attctgtttg | gggaaatttg | acgaacctct | ggacatgtct | 180 |
| | ctgttttctt | ttatcggtag | ccctcgaatc | aacgctaccg | gacagggggg | gacaatcttt | 240 |
| | tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactggggg | gaccgtgaac | 300 |
| | ggaggcattc | ctcagaaaat | atcactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| | acattctaca | tgccagtggg | caatctcgga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| 20 | cctacttggg | cccgaaattg | gaagcccagg | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| | gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccott | acagaagcca | ccgaaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| | ttcgagaaaag | ctgggaagga | tttctctggt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| | cctaaccacc | tctggggcta | ttatctgttc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| | cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| 25 | ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatatatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| | gtagccgcta | ccctctacgt | tccggaataga | gtgaggggaag | ccatcagggt | gtccaagatc | 840 |
| | cccgatgcc | aatctcccct | cccagtgttt | gcctacacca | ggatcgtggt | taccgaccag | 900 |
| | gtgttgaagt | tctctgagcca | ggacgagctc | gtgtataact | ttggcgagac | agttgctctg | 960 |
| | ggagcctctg | ggatcgtgat | ctggggcact | ctgagtatta | tgcgatcaat | gaagtcctgc | 1020 |
| 30 | ctgctgttgg | ataactacat | ggagacaatc | ctgaaccat | atatcattaa | cgtgactttg | 1080 |
| | gccgctaaga | tgtgttcaca | ggtgctgtgt | caagagcagg | gagtatgcat | taggaagaac | 1140 |
| | tggaaactcaa | gcgattatct | ccatctgaac | ccagataatt | ttgcaatcca | gctggaaaag | 1200 |
| | ggtggtaaat | tcactgtccg | agggaaagccc | acactcgagg | atctcgaaca | gtttagtgaa | 1260 |
| | aagttctact | gtagctgcta | tagcactctg | agttgtaagg | aaaaagccga | tgtgaaagac | 1320 |
| 35 | actgatgccg | ttgactgata | aggatcc | | | | 1347 |

<210> 183
<211> 1341

40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-DTDA con los sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 183

| | | | | | | | |
|----|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-----|
| | gctagcatgg | acatgagggt | accagcccag | ctgttgggcc | ttcttctgct | ttggctccct | 60 |
| | ggggcaaggg | gacttaactt | cagagctccc | cctgtaatcc | caaacgtccc | cttcctgtgg | 120 |
| 50 | gcatggaacg | cccctagcga | attctgtttg | gggaaatttg | acgaacctct | ggacatgtct | 180 |
| | ctgttttctt | ttatcggtag | ccctcgaatc | aacgctaccg | gacagggggg | gacaatcttt | 240 |
| | tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactggggg | gaccgtgaac | 300 |
| | ggaggcattc | ctcagaaaat | atcactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| | acattctaca | tgccagtggg | caatctcgga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| | cctacttggg | cccgaaattg | gaagcccagg | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| 55 | gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccott | acagaagcca | ccgaaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| | ttcgagaaaag | ctgggaagga | tttctctggt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| | cctaaccacc | tctggggcta | ttatctgttc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| | cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| | ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatatatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| 60 | gtagccgcta | ccctctacgt | tccggaataga | gtgaggggaag | ccatcagggt | gtccaagatc | 840 |

ES 2 724 588 T3

cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 gtggtgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 5 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaatt tcaactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgcct gataaggatc c 1341
 10
 <210> 184
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-VKDT con los sitios de restricción
 NheI y BamHI
 20
 <400> 184
 gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggetccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 25 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcaaaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg cccgaaattg gaagcccagg gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtcccct acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 30 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctgggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatac tcaacacaca gcagtcctca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggagg ccacagggg gtccaagatc 840
 35 cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 gtggtgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 40 tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaatt tcaactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 acttgataag gatcc 1335
 45
 <210> 185
 <211> 1329
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> ADN con codones optimizados de SPAM1-ADVK con los sitios de restricción
 NheI y BamHI
 <400> 185
 55 gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggetccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcaaaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 60

ES 2 724 588 T3

acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 5 cctaaccacc tctgggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatataatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggag ccatcagggt gtccaagatc 840
 cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 10 gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 15 ggtggtaaatt tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaatga 1320
 taaggatcc 1329

<210> 186
 20 <211> 35
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 25 <223> Péptido señal de PH20

<400> 186
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 30 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr
 35

35 <210> 187
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> PH20sHis

<400> 187
 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
 50 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
 55 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
 60 115 120 125

ES 2 724 588 T3

Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser His His His His His His
 485 490 495

 <210> 188
 50 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> PH20sHis-N368A (mut1)

 <400> 188
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 60 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | | |
| | Cys | Leu | Thr | Leu | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn | Val | Pro |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | 45 | | | | |
| 5 | 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 | |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | 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 | | | |
| 35 | 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 | |
| 40 | 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 | Ala |
| | | | 355 | | | | 360 | | | | | | 365 | | | |
| 45 | 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 | |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | 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 | His | His | His | His | His | His |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | | | 495 |
| 60 | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 724 588 T3

<210> 189
 <211> 496
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PH20sHis-N393A (mut2)

10 <400> 189
 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
 15 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35
 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
 20 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
 25 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
 30 145 150 155 160
 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
 35 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
 40 225 230 235 240
 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
 45 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
 50 305 310 315 320
 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
 55 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 Ala Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 60 385 390 395 400

ES 2 724 588 T3

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
 5 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
 10 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 His His His His His His
 485 490 495

 15 <210> 190
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> PH20sHis-N368A/N393A (mut3)

 <400> 190
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 165 170 175
 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
 50 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
 55 245 250 255
 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
 60 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr

ES 2 724 588 T3

290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 5 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 Ala
 355 360 365
 10 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 Ala Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 15 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
 20 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
 25 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser His His His His His His
 485 490 495

<210> 191
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 aa 431-447
 35 <400> 191
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 192
 <211> 16
 45 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 aa 431-446
 50 <400> 192
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
 1 5 10 15

<210> 193
 <211> 15
 <212> PRT
 60 <213> *Homo sapiens*

ES 2 724 588 T3

<220>
 <223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 aa 431-445

5 <400> 193
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 1 5 10 15

10 <210> 194
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 aa 431-444

<400> 194
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
 20 1 5 10

<210> 195
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 aa 431-443

30 <400> 195
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 1 5 10

35 <210> 196
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido C-terminal escindido de rHuPH20 aa 431-442

<400> 196
 45 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu
 1 5 10

<210> 197
 50 <211> 510
 <212> PRT
 <213> *Pan troglodytes*

<220>
 55 <223> PH20 de chimpancé

<400> 197
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 60 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | | |
| | Cys | Leu | Thr | Leu | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn | Val | Pro |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | 45 | | | | |
| 5 | 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 | | |
| 10 | 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 | | | | |
| 15 | 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 | | |
| 20 | 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 | | | | |
| 25 | 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 | | |
| 30 | 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 | | | | |
| 35 | 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 |
| | 305 | | | | 310 | | | | | | 315 | | | | 320 | |
| | Leu | Val | Tyr | Thr | Phe | Gly | Glu | Thr | Val | Ala | Leu | Gly | Ala | Ser | Gly | Ile |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| 40 | 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 | | | | |
| 45 | 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 | | |
| 50 | 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 | | | | |
| 55 | 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 | | |
| 60 | Leu | Cys | Asp | Leu | Tyr | Leu | Val | Pro | Thr | Ser | Tyr | Leu | Ile | Leu | | |

ES 2 724 588 T3

500 505 510

5 <210> 198
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> *Macaca mulatta*

10 <220>
 <223> PH20 de mono rhesus

<400> 198

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 55 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
 60 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 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 | |
| 5 | 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 | | | | |
| 10 | 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 | |
| 15 | Trp | Arg | Leu | Glu | Val | Trp | Asp | Gln | Gly | Ile | Ser | Arg | Ile | Gly | Phe | Phe |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | | 510 | | |

| | | |
|----|-------|--|
| | <210> | 199 |
| 20 | <211> | 1485 |
| | <212> | ADN |
| | <213> | Secuencia artificial |
| | <220> | |
| 25 | <223> | ADN con codones optimizados de SPAM1-LFLI con los sitios de restricción NheI y BamHI |

| | | | | | | | |
|----|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| | <400> | 199 | | | | | |
| 30 | gctagcatgg | acatgagggg | accagcccag | ctgttggggc | ttcttctgct | ttggctccct | 60 |
| | ggggcaaggg | gacttaactt | cagagctccc | ccgtgtaatcc | caaacgtccc | cttcctgtgg | 120 |
| | gcatggaacg | cccctagcga | attctgtttg | gggaaatttg | acgaacctct | ggacatgtct | 180 |
| | ctgttttctt | ttatcggtag | ccctcgaatc | aacgctaccg | gacagggggg | gacaatcttt | 240 |
| | tacgtggatc | gtctgggcta | ttacccttac | atcgacagca | ttactggggg | gaccgtgaac | 300 |
| | ggaggcattc | ctcagaaaat | atcactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| 35 | acattctaca | tgccagtggg | caatctcggg | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| | cctacttggg | cccgaattg | gaagcccaag | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| | gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccctt | acagaagcca | ccgaaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| | ttcgagaaaag | ctgggaagga | tttctgtggt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| | cctaaccacc | tctggggcta | ttatttgttc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| 40 | cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| | ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatatatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| | gtagccgcta | ccctctacgt | tcggaataga | gtgaggggag | ccatcagggt | gtccaagatc | 840 |
| | cccgatgcca | aatctcccct | cccagtgttt | gcctacacca | ggatcgtggt | taccgaccag | 900 |
| | gtggttgaagt | tcctgagcca | ggacgagctc | gtgtatactt | ttggcgagac | agttgctctg | 960 |
| 45 | ggagcctctg | ggatcgtgat | ctggggcact | ctgagtatta | tgcgatcaat | gaagtcctgc | 1020 |
| | ctgctgttgg | ataactacat | ggagacaatc | ctgaaccat | atatcattaa | cgtgactttg | 1080 |
| | gccgctaaga | tgtgttcaca | ggtgctgtgt | caagagcagg | gagtatgcat | taggaagaac | 1140 |
| | tggaaactcaa | gcgattatct | ccatctgaac | ccagataatt | ttgcaatcca | gctggaaaag | 1200 |
| | ggtggtaaat | tactgtccg | aggggaagccc | acactcgagg | atctcgaaca | gtttagttaa | 1260 |
| 50 | aagttctact | gtagctgcta | tagcactctg | agttgttaag | aaaaagccga | tgtgaaagac | 1320 |
| | actgatgccc | ttgacgtttg | catcgccgat | gggggtgcta | ttgacgcctt | tctcaagcca | 1380 |
| | ccaatggaga | ctgaggagcc | ccagatcttt | tacaacgcct | ccccctccac | cttgagtgtct | 1440 |
| | accatgttca | tcgtatctat | acttttctctg | atgtgataag | gatcc | | 1485 |

| | | |
|----|-------|----------------------|
| | <210> | 200 |
| 55 | <211> | 1479 |
| | <212> | ADN |
| | <213> | Secuencia artificial |
| | <220> | |
| 60 | <220> | |

ES 2 724 588 T3

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-SILF con los sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 200

```

5  gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtggggc ttcttctgct ttggctccct 60
   ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
   gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
   ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
   tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
10  ggaggcattc ctcagaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
   acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
   cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
   gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
   ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
15  cctaaccacc tctgggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
   cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
   ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
   gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggag ccatcagggt gtccaagatc 840
   cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
20  gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
   ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
   ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
   gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
   tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
25  ggtggtaaat tcaactgtccg agggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
   aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
   actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
   ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
   accatgttca tcgtatctat acttttctga taaggatcc 1479
30

```

<210> 201

<211> 1473

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN con codones optimizados de SPAM1-IVSI con los sitios de restricción
NheI y BamHI

40

<400> 201

```

   gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtggggc ttcttctgct ttggctccct 60
   ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
   gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
45  ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
   tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
   ggaggcattc ctcagaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
   acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
   cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
50  gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
   ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
   cctaaccacc tctgggggcta ttatttggtc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
   cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
   ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
55  gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggag ccatcagggt gtccaagatc 840
   cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
   gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
   ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
   ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccat atatcattaa cgtgactttg 1080
60  gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140

```

ES 2 724 588 T3

tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaatt tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagtttact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 5 ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgtc 1440
 accatgttca tcgtatctat atgataagga tcc 1473

<210> 202
 <211> 496
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PH20sHis N82A

15 <400> 202
 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 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
 25 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Ala 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
 30 100 105 110
 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
 35 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
 40 180 185 190
 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
 45 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
 50 260 265 270
 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
 55 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
 60 340 345 350

ES 2 724 588 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
 5 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
 10 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
 15 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 His His His His His His
 485 490 495
 20
 <210> 203
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> PH20sHis N166A
 <400> 203
 30 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
 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
 40 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
 45 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
 50 Lys Asp Val Tyr Lys Ala 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
 55 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
 60 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | 255 | | | |
| | Thr | Ala | Leu | Tyr | Pro | Ser | Ile | Tyr | Leu | Asn | Thr | Gln | Gln | Ser | Pro | Val |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| 5 | 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 | |
| 10 | 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 | | |
| 15 | 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 | |
| 20 | 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 | | | |
| 25 | 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 | |
| 30 | Phe | Tyr | Asn | Ala | Ser | Pro | Ser | Thr | Leu | Ser | His | His | His | His | His | His |
| | | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | <210> | 204 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 496 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | <223> | PH20sHis N235A | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 204 | | | | | | | | | | | | | | |
| | Met | Gly | Val | Leu | Lys | Phe | Lys | His | Ile | Phe | Phe | Arg | Ser | Phe | Val | Lys |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| 45 | 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 | | | |
| 50 | 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 | |
| 55 | 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 |
| 60 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | | 140 | | | |

ES 2 724 588 T3

Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 5 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
 10 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 Ala 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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 His His His His His His
 485 490 495
 45
 <210> 205
 <211> 496
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> PH20sHis N254A
 55 <400> 205
 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
 60 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| | Phe | Leu | Trp | Ala | Trp | Asn | Ala | Pro | Ser | Glu | Phe | Cys | Leu | Gly | Lys | Phe |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| 5 | 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 | | |
| 10 | 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 | | | | |
| 15 | 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 | | |
| 20 | 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 | | | | |
| 25 | 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 | Ala | Glu | Ser |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| | Thr | Ala | Leu | Tyr | Pro | Ser | Ile | Tyr | Leu | Asn | Thr | Gln | Gln | Ser | Pro | Val |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| 30 | 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 | | | | |
| 35 | 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 | | |
| 40 | 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 | | | | |
| 45 | 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 | |
| 50 | 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 | | | | |
| 55 | 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 | His | His | His | His | His | His |
| | | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | | 495 |

60 <210> 206

ES 2 724 588 T3

<211> 496
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> PH20sHis N82A/N166A

<400> 206

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Met | Gly | Val | Leu | Lys | Phe | Lys | His | Ile | Phe | Phe | Arg | Ser | Phe | Val | Lys |
| 10 | 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 | | | |
| 15 | 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 |
| 20 | Ile | Ala | 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 | | | |
| 25 | 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 |
| 30 | Lys | Asp | Val | Tyr | Lys | Ala | 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 | | | |
| 35 | 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 |
| 40 | 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 | | | |
| 45 | 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 |
| 50 | 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 | | | |
| 55 | 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 |
| 60 | Asn | Pro | Asp | Asn | Phe | Ala | Ile | Gln | Leu | Glu | Lys | Gly | Gly | Lys | Phe | Thr |
| | | | | 405 | | | | | | 410 | | | | | | 415 |

ES 2 724 588 T3

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
 5 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 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser His His His His His His
 485 490 495

<210> 207
 <211> 496
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PH20sHis N82A/N254A

20 <400> 207
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 25 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 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 30 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Ala Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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 Ala Glu Ser
 245 250 255
 55 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
 60 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu

ES 2 724 588 T3

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
 5 340 345 350
 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
 10 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
 15 420 425 430
 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
 20 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 His His His His His His
 485 490 495
 25
 <210> 208
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> PH20sHis N166A/N254A
 <400> 208
 35 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
 40 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
 45 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
 50 115 120 125
 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
 55 Lys Asp Val Tyr Lys Ala 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
 60 195 200 205

ES 2 724 588 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
 5 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Ala Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser His His His His His His
 485 490 495

40 <210> 209
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> PH20sHis N82A/N166A/N254A

<400> 209
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 50 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
 55 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 Ala Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 60 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly

ES 2 724 588 T3

100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 5 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 Ala Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 10 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
 15 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 Ala Glu Ser
 245 250 255
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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 His His His His His His
 485 490 495

50
 <210> 210
 <211> 1494
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN de PH20sHis

60 <400> 210

ES 2 724 588 T3

atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaate aagtggagta 60
 tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactcttaa cttcagagct 120
 ccccctgtaa tccc aaacgt ccccttctctg tgggcatgga acgcccctag cgaattctgt 180
 ttggggaaat ttgacgaacc tctggacatg tctctgtttt cttttatcgg tagccctcga 240
 5 atcaacgcta ccggacaggg ggtgacaatc ttttacgtgg atcgtctggg ctattaccct 300
 tacatcgaca gcattactgg ggtgaccgtg aacggaggca ttcctcagaa aatatcactg 360
 caggaccacc tggacaaagc taagaaggat attacattct acatgccagt ggacaatctc 420
 ggaatggctg tgattgactg ggaggagtgg agacctactt gggcccgaaa ttggaagccc 480
 aaggatgtgt ataagaaccg atccattgag ctgggtgcagc agcagaacgt gcagctgtcc 540
 10 cttacagaag ccaccgaaaa agctaagcag gaattcgaga aagctgggaa ggatttcctg 600
 gttgagacaa taaaacttgg gaaactgctt agacctaac acctctgggg ctattatttg 660
 ttccccgatt gctacaatca ccaactataag aagcccggct acaacggatc ttgtttcaac 720
 gtcgaaatta aaagaaacga tgacctctct tggttgtgga atgagtctac tgcactctac 780
 ccctctatat atctcaacac acagcagtc cagtagccg ctaccctcta cgttcggaat 840
 15 agagtgaggg aagccatcag ggtgtccaag atccccgatg ccaaactctcc cctcccagtg 900
 tttgcctaca ccaggatcgt gtttaccgac caggtgttga agttcctgag ccaggacgag 960
 ctctgtgata cttttggcga gacagttgct ctgggagcct ctgggatcgt gatctggggc 1020
 actctgagta ttatgcgatc aatgaagtcc tgectgctgt tggataacta catggagaca 1080
 atcctgaacc catatatcat taacgtgact ttggccgcta agatgtgttc acagggtgctg 1140
 20 tgtcaagagc agggagtatg cattaggaag aactggaact caagcgatta tctccatctg 1200
 aaccagata attttgcaat ccagctggaa aagggtggta aattcactgt ccgagggaaag 1260
 cccacactcg aggatctcga acagttagt gaaaagttct actgtagctg ctatagcact 1320
 ctgagttgta aggaaaaagc cgatgtgaaa gacactgatg ccggtgacgt ttgcatcgcc 1380
 gatgggggtgt gtattgacgc ctttctcaag ccaccaatgg agactgagga gcccagatc 1440
 25 ttttacaacg cctccccctc caccttgagt catcatcacc atcatcatta gtaa 1494

<210> 211
 <211> 1497
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SPAM1-ISSV

35 <400> 211
 gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtggggc ttcttctgct ttggctccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg ccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 40 ctgttttctt ttatcggtag ccctogaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcaaaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtgga caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 45 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtccccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaa ccatcagggt gtccaagatc 840
 50 cccgatgcca aatctccccct cccagtgttt goctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tccgtagcca ggacgagctc gtgtataact ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtccctg 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccocat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 55 tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaat tcaactgtccg agggaaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgtc 1440
 60 accatgttca tcgtatctat acttttctctg attatatcaa gcgtgtgata aggatcc 1497

ES 2 724 588 T3

<210> 212
 <211> 1491
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SPAM1-LIIS

10 <400> 212
 gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 15 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtggg caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 20 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggaa ccatcagggt gtccaagatc 840
 25 cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaaccocat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 30 tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaat tcaactgtccg aggggaagccc aactcagagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
 35 accatgttca tcgtatctat acttttctctg attatatcat gataaggatc c 1491

<210> 213
 <211> 1467
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SPAM1-MFIV

45 <400> 213
 gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 50 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtggg caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 55 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgaggggaa ccatcagggt gtccaagatc 840
 60 cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtggt taccgaccag 900

ES 2 724 588 T3

gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 5 tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaatt tcaactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
 10 accatgttca tcgtatgata aggatcc 1467

<210> 214
 <211> 1461
 <212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SPAM1-ATMF

20 <400> 214
 gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggtccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 25 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300
 ggaggcattc ctcaaaaaat atcaactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
 acattctaca tgccagtggg caatctcggg atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
 cctacttggg cccgaaattg gaagcccagg gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
 gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
 30 ttcgagaaaag ctgggaagga tttcctgggt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
 cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
 cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
 ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccc 780
 gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggagg ccatcagggg gtccaagatc 840
 35 cccgatgccca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
 gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
 ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
 ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
 gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
 40 tggaaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
 ggtggtaaatt tcaactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
 aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
 actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
 ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cccctccac cttgagtgtc 1440
 45 accatgttct gataaggatc c 1461

<210> 215
 <211> 1455
 <212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SPAM1-LSAT

55 <400> 215
 gctagcatgg acatgagggg accagcccag ctggtgggcc ttcttctgct ttggtccct 60
 ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
 gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
 ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggg gacaatcttt 240
 60 tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggg gaccgtgaac 300

ES 2 724 588 T3

| | | | | | | | |
|----|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| | ggaggcattc | ctcagaaaat | atcactgcag | gaccacctgg | acaaagctaa | gaaggatatt | 360 |
| | acattctaca | tgccagtgga | caatctcgga | atggctgtga | ttgactggga | ggagtggaga | 420 |
| | cctacttggg | cccgaaattg | gaagcccaag | gatgtgtata | agaaccgatc | cattgagctg | 480 |
| | gtgcagcagc | agaacgtgca | gctgtccctt | acagaagcca | ccgaaaaagc | taagcaggaa | 540 |
| 5 | ttcgagaaag | ctgggaagga | tttctctggt | gagacaataa | aacttgggaa | actgcttaga | 600 |
| | cctaaccacc | tctgggggcta | ttatctgttc | cccgattgct | acaatcacca | ctataagaag | 660 |
| | cccggctaca | acggatcttg | tttcaacgtc | gaaattaaaa | gaaacgatga | cctctcttgg | 720 |
| | ttgtggaatg | agtctactgc | actctacccc | tctatataatc | tcaacacaca | gcagtcccca | 780 |
| | gtagccgcta | ccctctacgt | tcggaataga | gtgaggggaag | ccatcagggg | gtccaagatc | 840 |
| 10 | cccgatgcca | aatctcccct | cccagtgttt | gcctacacca | ggatcgtggt | taccgaccag | 900 |
| | gtgttgaagt | tcttgagcca | ggacgagctc | gtgtatactt | ttggcgagac | agttgctctg | 960 |
| | ggagcctctg | ggatcgtgat | ctggggcaact | ctgagtatta | tgcgatcaat | gaagtcctgc | 1020 |
| | ctgctgttgg | ataactacat | ggagacaatc | ctgaacccat | atatcattaa | cgtgactttg | 1080 |
| | gccgctaaga | tgtgttcaca | ggtgctgtgt | caagagcagg | gagtatgcat | taggaagaac | 1140 |
| 15 | tggaactcaa | gcgattatct | ccatctgaac | ccagataatt | ttgcaatcca | gctggaaaag | 1200 |
| | ggtggtaaat | tactgtccg | agggagccc | acactcgagg | atctcgaaca | gtttagttaa | 1260 |
| | aagttctact | gtagctgcta | tagcactctg | agttgtaagg | aaaaagccga | tgtgaaagac | 1320 |
| | actgatgccg | ttgacgtttg | catcgccgat | gggggtgtgta | ttgacgcctt | tctcaagcca | 1380 |
| | ccaatggaga | ctgaggagcc | ccagatcttt | tacaacgcct | ccccctccac | cttgagtgtc | 1440 |
| 20 | acctgataag | gatcc | | | | | 1455 |

REIVINDICACIONES

1. Hialuronidasa PH20 soluble extendida (esPH20), en la que:
 - 5 el polipéptido de esPH20 es activo a pH neutro;
 - el polipéptido de esPH20 es soluble; y
 - 10 el polipéptido de esPH20 se selecciona de entre:
 - un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta como residuos de aminoácido 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107; o
 - 15 un polipéptido que contiene sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107, mediante lo cual el polipéptido con aminoácidos sustituidos consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la secuencia de aminoácidos correspondiente expuesta como aminoácidos 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107.
- 20 2. esPH20 según la reivindicación 1 que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta como aminoácidos 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 ó 36-500 de SEQ ID NO: 107.
3. esPH20 según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que está N-glicosilada.
- 25 4. esPH20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la esPH20 está N-glicosilada y comprende al menos un resto N-acetilglucosamina unido a cada uno de al menos tres residuos de asparagina (N).
5. esPH20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que está purificada o aislada.
- 30 6. Conjugado, que comprende la esPH20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la esPH20 es soluble.
7. Conjugado según la reivindicación 6, en el que la esPH20 se conjuga con un polímero.
- 35 8. Conjugado según la reivindicación 7, en el que el polímero es dextrano o PEG.
9. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que la esPH20 se conjuga con un resto seleccionado de entre un dominio de multimerización, toxina, marcador detectable y fármaco.
- 40 10. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que la esPH20 se conjuga con un resto que es un dominio Fc.
11. Molécula de ácido nucleico que codifica para la esPH20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la molécula de ácido nucleico no codifica para una hialuronidasa PH20 de longitud completa sino que
 - 45 codifica para la hialuronidasa PH20 truncada.
12. Vector, que comprende un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica para la esPH20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la secuencia de nucleótidos incluye o va seguida inmediatamente por un codón de terminación operativamente insertado en el vector para la
 - 50 expresión de la esPH20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
13. Vector según la reivindicación 12 que es un vector de virus.
14. Célula aislada o cultivo celular, que comprende el vector según la reivindicación 12 o la reivindicación 13 o una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 11.
- 55 15. Célula o cultivo celular según la reivindicación 14, en el que la célula es una célula CHO o el cultivo celular comprende una célula CHO.
- 60 16. Composición, que comprende una esPH20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 6-10.
17. Composición farmacéutica, que comprende una esPH20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 6-10.
- 65 18. Composición farmacéutica según la reivindicación 17, que comprende un agente terapéutico adicional.

19. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que el agente terapéutico se selecciona de entre:
- 5 un agente quimioterápico, un agente analgésico, un agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente amebicida, un agente tricomonocida, un agente antiparkinsoniano, un agente antipalúdico, un agente anticonvulsivo, un agente antidepressivo, un agente antiartrítico, un agente antifúngico, un agente antihipertensivo, un agente antipirético, un agente antiparasitario, un agente antihistaminico, un agente agonista alfa-adrenérgico, un agente alfabloqueante, un agente anestésico, un agente broncodilatador, un agente biocida, un agente bactericida, un agente bacteriostático, un agente bloqueante beta-adrenérgico, un agente bloqueante de canales de calcio, un agente farmacológico cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente descongestivo, un agente diurético, un agente depresivo, un agente de diagnóstico, un agente de electrolito, un agente hipnótico, un agente hormonal, un agente hiperglicémico, un agente relajante muscular, un agente contractor muscular, un agente oftálmico, un agente parasimpatomimético, un agente energizante psíquico, un agente sedante, un agente simpatomimético, un agente tranquilizante, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente de vitamina, un agente antiinflamatorio no esteroideo, un agente inhibidor de enzima convertidora de angiotensina, un polipéptido, una proteína, un ácido nucleico, un fármaco, una molécula orgánica o un inductor del sueño; un anticuerpo, una inmunoglobulina, una citocina y una insulina.
20. Composición farmacéutica según la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en la que el agente terapéutico comprende un anticuerpo.
21. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que el agente terapéutico adicional se selecciona de entre acivicinas; aclarubicinas; acodazoles; acroninas; adozelesinas; aldesleucinas; alemtuzumabs; alitretinoínas (ácidos 9-cis-retinoicos); alopurinoles; altretaminas; alvocidibs; ambazonas; ambomicinas; ametantronas; amifostinas; aminoglutetimidas; amsacinas; anastrozoles; anaxironas; ancitabinas; antramincinas; apaziquonas; argimesnas; trióxidos arsénicos; asparaginasas; asperlinas; atrimustinas; azacitidinas; azetepas; azotomicinas; banoxantronas; batabulinas; batimastats; BCG vivo; benaxibinas; bendamustinas; benzodepas; bexaroteno; bevacizumab; bicalutamidas; bietaserpinas; biricodars; bisantrenos; bisantrenos; dimesilatos de bisnafida; bizelesinas; bleomicinas; bortezomibs; brequinar; propirriminas; budotitanos; busulfanos; cactinomicinas; calusteronas; canertinibs; capecitabinas; caracemidas; carbetímeros; carboplatinos; carboquonas; carmofurs; carmustinas con polifeprosanos; carmustinas; carubicinas; carzelesinas; cedefingoles; celecoxibs; cemadotinas; clorambucilos; cioteronels; cirolemicinas; cisplatinos; cladribinas; clanfenurs; clofarabinas; crisnatoles; ciclofosfamidinas; citarabinas liposomales; citarabinas; dacarbazinas; dactinomicinas; darbeopetinas alfa; daunorubicinas liposomales; daunorubicinas/daunomicinas; daunorubicinas; decitabinas; denileucinas difitox; dextrinidulpidinas; dextonas; dexrazoxanos; dezaguaninas; diaziquonas; dibrospidios; dienogests; dinalinas; disermolidas; docetaxeles; dofequidars; doxilfluridinas; doxorubicinas liposomales; doxorubicina HCl; inyección de liposomas de doxorubicina HCl; doxorubicinas; droloxifenos; propionatos de dromostanolona; duazomicinas; ecomustinas; edatrexatos; edotecarinas; eflornitinas; elacridars; elinafidas; disoluciones B de Elliot; elsamitricinas; emitefurs; enloplatinos; enpromatos; enzastaurinas; epipropidinas; eprubicinas; epoetinas alfa; eptaloprosts; erbulozoles; esorubicinas; estramustinas; etanidazoles; etoglúcidos; fosfatos de etopósido; etopósidos VP-16; etopósidos; etoprinas; exemestanos; exisulinds; fadrozoles; fazarabinas; fenretinidas; filgrastims; floxuridinas; fludarabinas; fluorouracilos; 5-fluorouracilos; fluoximesterona; fluorocitabinas; fosquidonas; fostriecinas; fostriecinas; fotretaminas; fulvestrants; galarubicinas; galocitabinas; gemcitabinas; gentuzumabs/ozogamicinas; geroquinoles; gimatecanos; gimeracilos; gloxazonas; glufosfamidas; acetatos de goserelina; hidroxureas; ibritumomabs/tiuxetanos; idarubicinas; ifosfamidas; ilmofofosinas; ilomastats; mesilatos de imatinib; imexonas; improsulfanos; indisulams; inproquonas; interferones α -2a; interferones α -2b; interferones alfa; interferones beta; interferones gamma; interferones; interleucinas-2 y otras interleucinas (incluyendo interleucinas recombinantes); intoplicinas; iobenguanos [131-I]; ioprolatinos; irinotecanos; irsogladinas; ixabepilonas; ketotrexatos; L-alanosinas; lanreotidas; lapatinibs; ledoxantronas; letrozoles; leucovorinas; leuprolidas; leuprorelinas (leuprorelidas); levamisoles; lexacalcitoles; liarozoles; lobaplatinos; lometrexoles; lomustinas/CCNU; lomustinas; lonafarnibs; losoxantronas; lurtotecanos; mafosfamidas; manosulfanos; marimastats; masoprocoles; maitansinas; mecloretaminas; mecloretaminas/mostazas de nitrógeno; acetatos de megestrol; megestroles; melengestroles; melfalanos; L-PAM; menogarilos; mepitiostanos; mercaptopurinas; 6-mercaptopurina; mesnas; metesinds; metotrexatos; metoxsalenos; metomidatos; metoprinas; meturedepas; miboplatinos; miproxifenos; misonidazoles; mitindomidinas; mitocarcinas; mitocrominas; mitoflaxonas; mitogilinas; mitoguazonas; mitomalquinas; mitomicinas C; mitomicinas; mitonafidas; mitoquidonas; mitospers; mitotanos; mitoxantronas; mitozolomidinas; mivobulinas; mizoribinas; mofaroteno; mopidamoles; mubritinibs; ácidos micofenólicos; fenpropionatos de nandrolona; nedaplatinos; nelarabinas; nemorubicinas; nitracinas; nocodazoles; nofetumomabs; nogalamincinas; nolatrexeds; nortopixantronas; octreotidas; oprelvekinas; ormaplatinos; ortataxelas; oteracilos; oxaliplatinos; oxisuranos; oxofenarsinas; paclitaxelas; pamidronatos; patupilonas; pegademasas; pegasparginas; pegfilgrastims; peldesinas; peliomincinas; pelitrexoles; pemetrexeds; pentamustinas; pentostatinas; peplomincinas; perfosfamidas; perifosinas; picoplatinos; pinafidinas;

- pipobromanos; piposulfanos; pirfenidonas; piroxantronas; pixantronas; plevitrexeds; mitramicinas
 plicamicidas; plicamicinas; plomestanos; plomestanos; porfímeros sódicos; porfímeros; porfiromicinas;
 prednimustinas; procarbazinas; propamidinas; prospidios; pumitepas; puromicinas; pirazofurinas;
 5 quinacrinas; ranimustinas; rasburicasas; riboprinas; ritrosulfanos; rituximabs; rogletimidas; roquinimexs;
 rufocromomicinas; sabarubicinas; safingoles; sargramostims; satraplatinos; seabriplatinos; semustinas;
 simtrazenos; sizofiranos; sobuzoxanos; sorafenibs; esparfosatos; ácidos esparfósicos; esparsomicinas;
 espirogermanios; espiromustinas; espiroplatinos; espiroplatinos; escualaminas; estreptonigrinas;
 10 estreptovaricinas; estreptozocinas; sufosfamidas; sulofenurs; malato de sunitinib; 6-TG; tacedinalinas;
 talcos; talisomicinas; talimustinas; tamoxifenos; tariquidars; tauromustinas; tecogalanos; tegafurs;
 teloxantronas; temoporfinas; temozolomidas; tenipósidos/VM-26; tenipósidos; teroxironas; testolactonas;
 tiamiprinas; tioguaninas; tiotepas; tiamiprinas; tiazofurinas; tilomisoles; tiloronas; timcodars; timonacics;
 tirapazaminas; topixantronas; topotecanos; toremifenos; tositumomabs; trabectedinas (ecteinascidina 743);
 15 trastuzumabs; trestolonas; tretinoínas/ATRA; triciribinas; trilostanos; trimetrexatos; tetranitratos de triplatino;
 triptorelinas; trofosfamidas; tubulozoles; ubenimexs; mostazas de uracilo; uredepas; valrubicinas;
 valsopodars; vaporeotidas; verteporfinas; vinblastinas; vincristinas; vindesinas; vinepidinas; vinfluninas;
 vinformidas; vinglicinatos; vinleucinoles; vinleurosinas; vinorelbina; vinrosidinas; vintriptoles; vinzolidinas;
 vorozoles; xantomycinas A (guameciclinas); zeniplatinos; zilascorbs [2-H]; zinostatinas; zoledronato;
 zorubicinas; y zosuquidars.
- 20 22. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 17-21 para su uso en el tratamiento de
 una enfermedad o estado asociado a hialuronano; para su uso en el tratamiento de un exceso de
 25 glicosaminoglicanos; para su uso en el tratamiento de un tumor; para su uso en el tratamiento de la
 acumulación de glicosaminoglicanos en el cerebro; para su uso en el tratamiento de un trastorno
 cardiovascular; para su uso en el tratamiento de un trastorno oftálmico; para su uso en el tratamiento de
 una enfermedad pulmonar; para su uso en el tratamiento de celulitis; o para su uso en el tratamiento de un
 trastorno proliferativo.
23. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 17-21 para aumentar la penetración de
 30 agentes quimioterápicos en tumores sólidos o para aumentar la biodisponibilidad de fármacos y otros
 agentes terapéuticos.
24. Combinación, que comprende:
 35 una primera composición que contiene un polipéptido de esPH20 según cualquiera de las reivindicaciones
 1-5 o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 6-10; y
 una segunda composición que comprende un agente terapéutico.
25. Vector según la reivindicación 13 para su uso para tratar un tumor.
26. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 17-21 para su uso para tratar un tumor.
27. Polipéptido de esPH20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o conjugado según cualquiera de las
 45 reivindicaciones 6-10, para su uso en terapia de combinación con un agente terapéutico, en el que la
 esPH20 es para su administración antes, de manera posterior, intermitente o simultánea al agente
 terapéutico.
28. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 22 o la reivindicación 26 o el polipéptido de
 50 esPH20 para su uso según la reivindicación 27, en la que el polipéptido de esPH20 se administra de modo
 que alcanza el intersticio de la piel o los tejidos.
29. Composición farmacéutica o polipéptido de esPH20 para su uso según la reivindicación 28, en el que el
 polipéptido de esPH20 se administra mediante métodos de administración subcutánea.

55

| | |
|-------------------|---|
| PH20 humana | MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSIQVFTFLIPCCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFC 60 |
| PH20 de chimpancé | MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSIQVFTFLIPCCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFC 60 ***** |
| PH20 humana | LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120 |
| PH20 de chimpancé | LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINVTGQDVTIFVDRLLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120 ***** |
| PH20 humana | QDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPDVYKNRSIELVQQQNVQLS 180 |
| PH20 de chimpancé | QDHLDKAKKIDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPDVYKNRSIELVQQQNVQLS 180 ***** |
| PH20 humana | LTEATEKAKQEFKAGKDFLVEIKLGKLLRPNHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFN 240 |
| PH20 de chimpancé | LTEATEKAKQEFKAGKDFLVEIKLGKLLRPNHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFN 240 ***** |
| PH20 humana | VEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSLPV 300 |
| PH20 de chimpancé | VEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSLPV 300 ***** |
| PH20 humana | FAYTRIVTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360 |
| PH20 de chimpancé | FVYTRIVFDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360 ***** |
| PH20 humana | ILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK 420 |
| PH20 de chimpancé | ILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK 420 ***** |
| PH20 humana | PTLEDLEQFSEKFCYCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFLLKPPMETEEPQI 480 |
| PH20 de chimpancé | PTLEDLEQFSEKFCYCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFLLKPPMETEESQI 480 ***** |
| PH20 humana | FYNASPSTLSATMFI-VSILFLIISVASL 509 |
| PH20 de chimpancé | FYNASPSTLSATMFI <u>DLCDLYLVPTSYLIL</u> 510 ***** |

FIG. 1

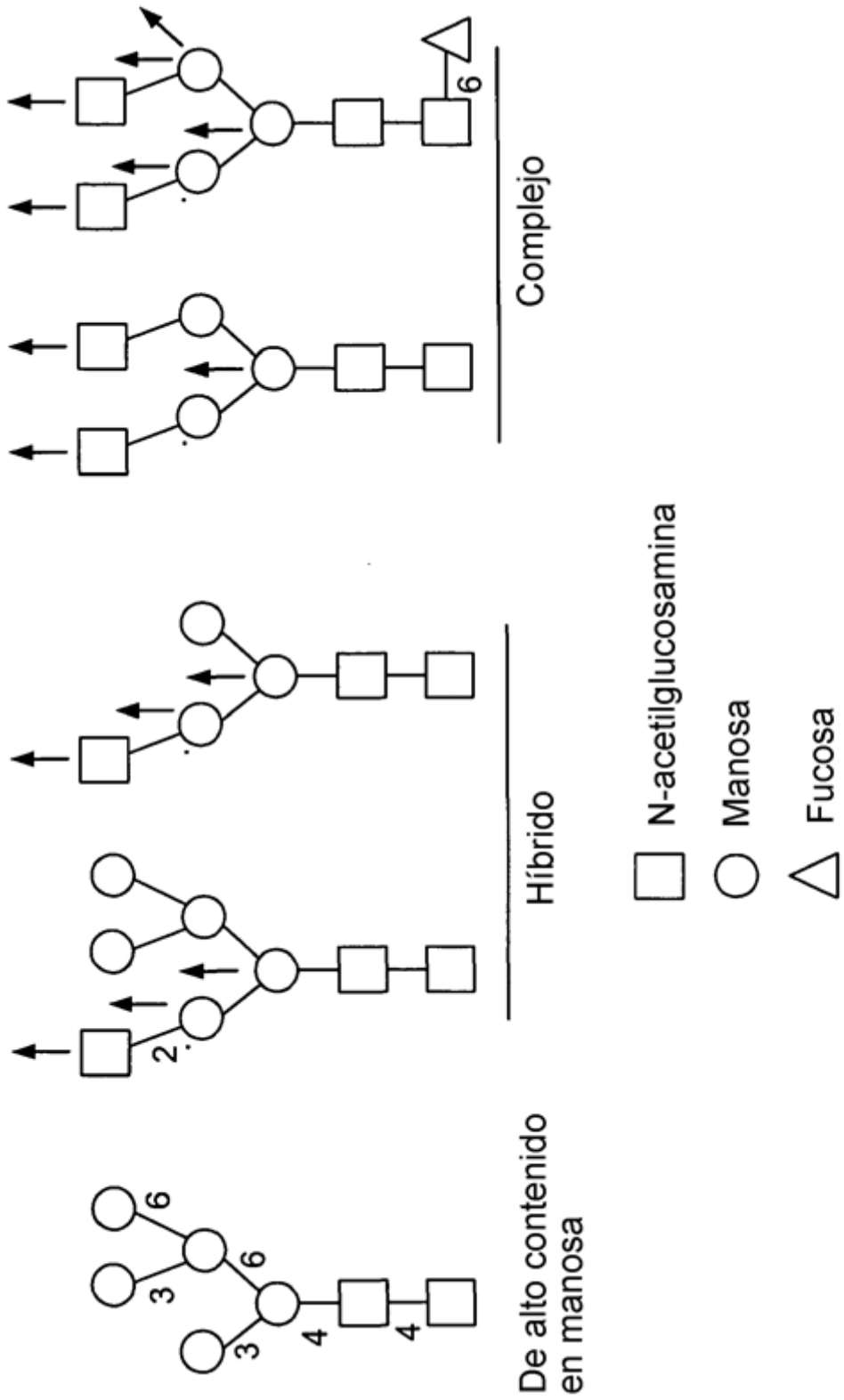


FIG. 2

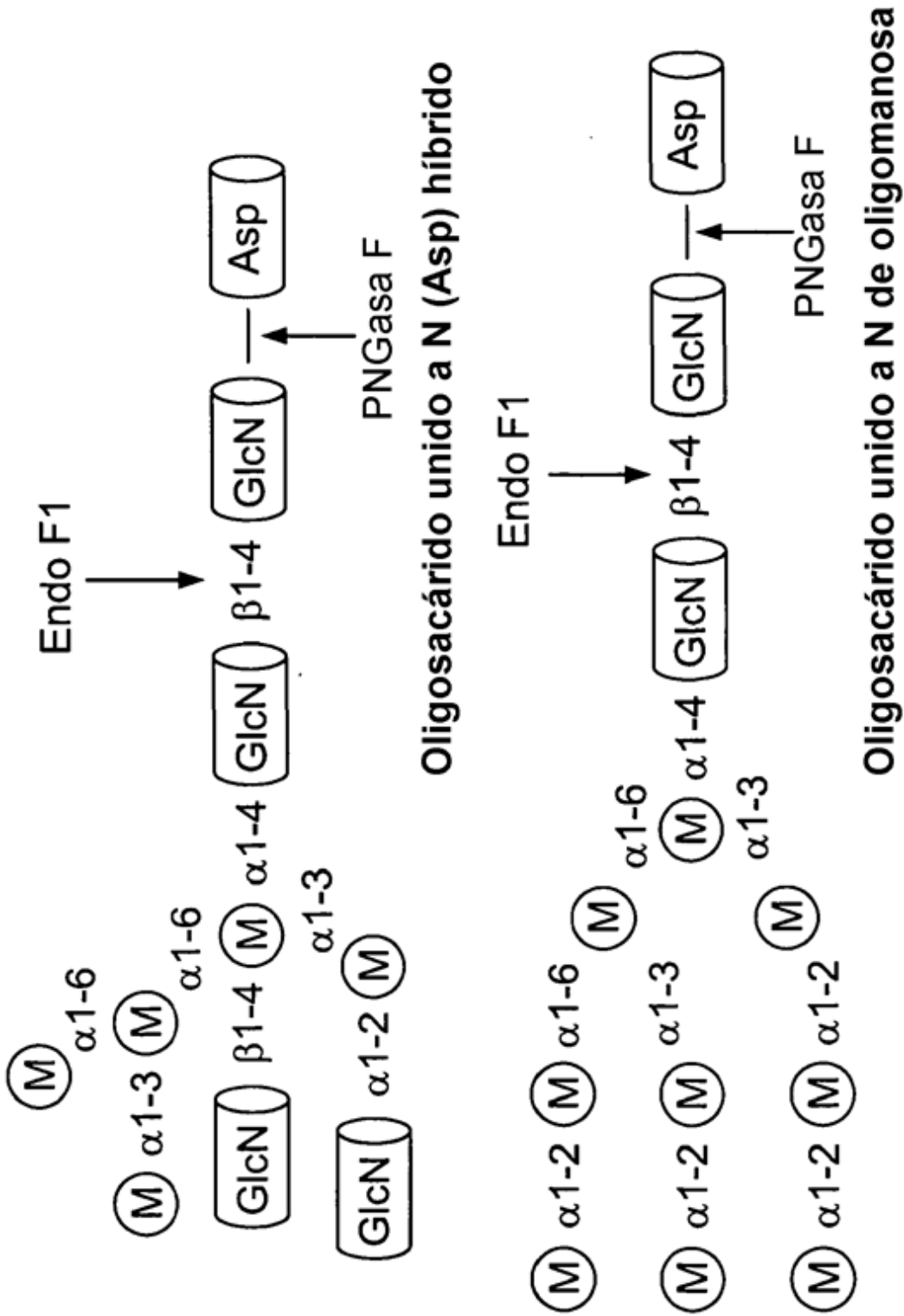


FIG. 3A

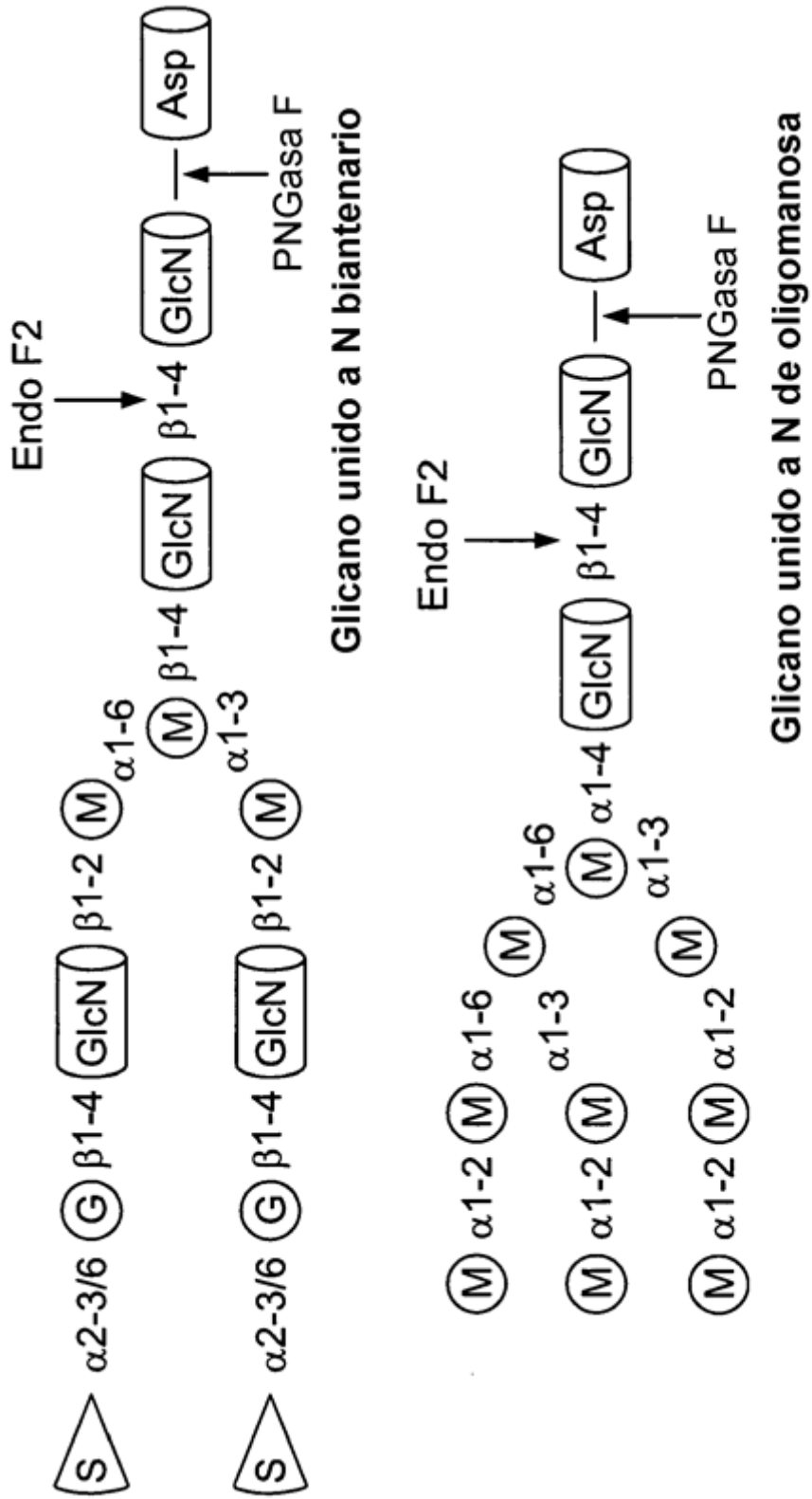


FIG. 3B

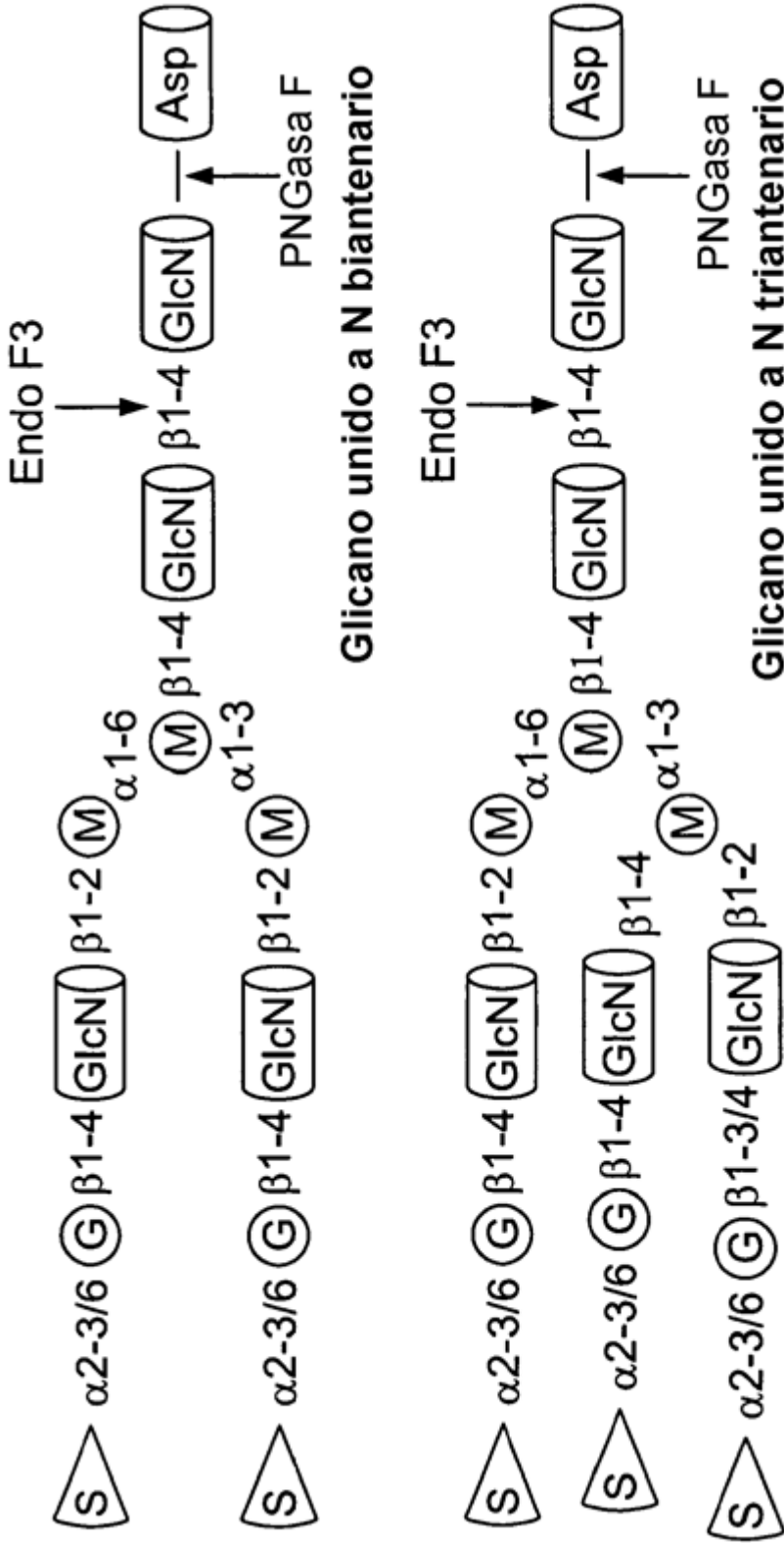


FIG. 3C

