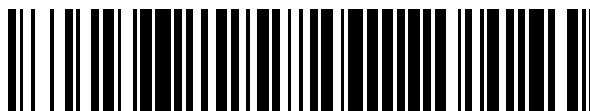


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 137**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2015** **PCT/US2015/047588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016** **WO16033555**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2015** **E 15760604 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 3186281**

54 Título: **Terapia combinada con una enzima de degradación de hialuronano y un inhibidor de puntos de control inmunitario**

30 Prioridad:

28.08.2014 US 201462043351 P

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

14.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ROSENGREN, SANNA;
SHEPARD, H., MICHAEL y
THOMPSON, CURTIS, B.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 727 137 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

Terapia combinada con una enzima de degradación de hialuronano y un inhibidor de puntos de control inmunitario**Campo de la invención**

En la presente memoria se proporcionan combinaciones de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, y un inhibidor de puntos de control inmunitario. Las combinaciones se pueden utilizar en la terapia combinada para mejorar cualquier terapia que incluya la administración de inhibidores de puntos de control inmunitario. La terapia combinada se puede utilizar en métodos de tratamiento del cáncer, incluidos tumores sólidos y no sólidos.

Antecedentes

Las enzimas que degradan hialuronano, tales como PH20, se utilizan en los métodos para el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con el hialuronano, incluidos los cánceres y, en particular, los cánceres o tumores asociados con el hialuronano. El hialuronano (ácido hialurónico; HA) es un glicosaminoglicano que existe predominantemente en los tejidos conectivos, la piel, el cartílago y el líquido sinovial en los mamíferos. En el tejido conectivo, el agua de hidratación asociada con el hialuronano crea matrices hidratadas entre los tejidos. El HA se encuentra en la matriz extracelular de muchas células, especialmente en los tejidos conectivos blandos. Ciertas enfermedades están asociadas con la expresión y/o producción de hialuronano, incluidos los tumores sólidos. Las hialuronidasas son enzimas que degradan el hialuronano. Al catalizar la descomposición del HA, las hialuronidasas se pueden utilizar para tratar enfermedades o trastornos asociados con la acumulación de HA u otros glicosaminoglicanos, incluidos los cánceres y los tumores. Para el tratamiento de cánceres, y en particular cánceres de tumores sólidos, existe la necesidad de tratamientos terapéuticos mejorados o alternativos.

Scodeller P. (Hyaluronidase and other Extracellular Matrix Degrading Enzymes for Cancer Therapy: New Uses and nano-Formulations. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*. (2014) 5(178)) es una revisión sobre el uso de hialuronidasa combinada con fármacos convencionales contra el cáncer, por ejemplo, gemcitabina, carboplatino, adriamicina, doxorubicina liposomal, adenovirus oncolítico ICOVIR5 y radioterapia. La revisión describe cómo se pueden utilizar las enzimas que degradan la matriz extracelular, tales como las hialuronidasas, para mejorar la penetración en los tumores y la administración de fármacos contra el cáncer convencionales.

Chiu et al. (Advanced Pancreatic Cancer: Flourishing Novel Approaches in the Era of Biological Therapy. *The Oncologist*. (2014) 19(9): 937-950) proporcionan una visión general de la terapia del cáncer de páncreas. Explican que los tratamientos principales para este tipo de cáncer incluyen gemcitabina, FOLFIRINOX y *nab*-paclitaxel, pero que se necesitan tratamientos mejorados. La inmunoterapia y los enfoques personalizados para el tratamiento se sugieren como formas de mejorar el tratamiento para este tipo de cáncer.

Callahan et al. At the Bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*. (2013) 94(1): 41-53) describen el uso de los anticuerpos bloqueadores de CTLA-4 y PD-1 en el tratamiento del cáncer.

Compendio

La presente invención proporciona una combinación que comprende:

- una primera composición que comprende una hialuronidasa, en donde la hialuronidasa se conjuga con un polímero o se formula para la liberación lenta o se codifica en un vector para su suministro a un tumor; y
- una segunda composición que comprende un inhibidor de puntos de control inmunitario, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo anti-CTLA4, anti-PD-1 o anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Adicionalmente, se proporciona un inhibidor de puntos de control inmunitario para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto, en donde:

- el sujeto ha sido tratado con una hialuronidasa;
- la hialuronidasa se conjuga con un polímero o se formula para la liberación sostenida,
- en donde el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo anti-CTLA4, anti-PD-1 o anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Las combinaciones y la terapia combinada incluyen una primera composición que comprende una enzima de degradación de hialuronano; y una segunda composición que comprende el inhibidor de puntos de control inmunitario como se define en las reivindicaciones. Las composiciones se pueden administrar por separado o juntas o secuencialmente o intermitentemente. Las composiciones se pueden formular como una única composición. Los cánceres incluyen

tumores sólidos y también tumores no sólidos, tales como los cánceres hematológicos. Como saben los expertos en la técnica, los cánceres pueden ser inmunosupresores. Se han desarrollado modalidades de tratamiento que revierten, inhiben o disminuyen los efectos inmunosupresores de los cánceres para mejorar o restaurar de ese modo la respuesta inmunitaria contra tumores y células tumorales. Las combinaciones y combinaciones para su uso en la

5 presente memoria combinan estos tratamientos con agentes que reducen la cantidad de hialuronano asociado con tumores y células tumorales. Tales agentes son enzimas que degradan el hialuronano. Las enzimas que degradan el hialuronano se formulan, modifican o producen de modo que tengan suficiente semivida en el suero para efectuar el tratamiento.

10 En la presente memoria se proporcionan combinaciones de acuerdo con las presentes reivindicaciones para su uso en el tratamiento del cáncer. Las combinaciones contienen un primer agente que disminuye la cantidad de hialuronano presente en las células tumorales/cancerosas y un segundo agente que mitiga el microentorno del cáncer inmunosupresor. El primer y el segundo agentes pueden estar en composiciones separadas o se pueden formular en la misma composición;

15 el primer y el segundo agentes se pueden administrar de forma simultánea, secuencial, intermitente o en cualquier orden.

En realizaciones particulares, se proporcionan combinaciones de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en terapia combinada de cánceres que incluyen tumores sólidos y otros tumores. Las combinaciones contienen una

20 primera composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano, es decir, hialuronidasa, que se conjuga con un polímero o se formula o se proporciona de una manera que aumenta la semi-vida sérica de la misma, y una segunda composición que contiene el inhibidor de puntos de control inmunitario. Las composiciones se pueden formular juntas, pero típicamente se proporcionan por separado y se administran por separado. Se pueden administrar de forma secuencial, intermitente o simultánea o en cualquier orden. La enzima de degradación de

25 hialuronano, es decir, la hialuronidasa, se administra secuencialmente, antes o después del inhibidor de puntos de control, tal como antes del inhibidor de puntos de control. En tales realizaciones, generalmente la enzima de degradación de hialuronano, es decir, la hialuronidasa, se administra menos de 1 o 2 días antes, tal como 48 horas o menos, tal como menos de 40, 35, 30, 25, 24, 20, 18, 15, 12, 10, 8, 5 o menos horas antes del inhibidor de puntos de control. Los inhibidores de puntos de control son anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos

30 que inhiben el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) o la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4; también conocida como CD152). La inhibición de proteínas y otros factores que suprimen el sistema inmunológico previenen o disminuyen la regulación por disminución del sistema inmunológico, por lo que el sistema inmunológico sigue reconociendo y atacando a las células tumorales.

35 En la presente memoria se muestra, por ejemplo, que la administración de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, o un inhibidor de la síntesis de hialuronano, y un inhibidor de puntos de control inmunitario, puede aumentar la respuesta de una célula tumoral o célula cancerosa al tratamiento con el inhibidor. Por ejemplo, en una realización ilustrativa, la administración de un enzima de degradación de hialuronano, antes de la administración del inhibidor de CTLA4 o PD-L1 mejora el tratamiento de tumores en comparación con el

40 inhibidor solo.

En la presente memoria se proporcionan combinaciones de la enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, e inhibidores de puntos de control de acuerdo con las presentes reivindicaciones para su uso en el tratamiento de cánceres. Para efectuar el tratamiento o uso de las composiciones en las combinaciones, los

45 usos incluyen la administración de una primera composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano, particularmente una enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero, seguida de la administración de una segunda composición que contiene el inhibidor de puntos de control inmunitario. En cualquiera de tales usos, la composición de enzima de degradación de hialuronano y la composición inhibidora de puntos de control inmunitario se pueden administrar por la misma vía de administración o por diferentes vías de

50 administración. La composición enzimática de degradación de hialuronano y la composición inhibidora de puntos de control inmunitario se pueden administrar por la misma vía de administración. En cualquiera de las combinaciones proporcionadas para su uso, la composición de enzima de degradación de hialuronano y la composición inhibidora de puntos de control inmunitario se pueden administrar sistémicamente, por ejemplo, por administración intravenosa.

55 En ciertas realizaciones de las combinaciones para uso, la composición que contiene la enzima de degradación de hialuronano se administra antes de la administración del inhibidor de puntos de control. El inhibidor de puntos de control inmunitario se puede administrar en el plazo de las 48 horas posteriores a la administración de la enzima de degradación de hialuronano, tal como al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente a los 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24

60 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas de la administración de la enzima de degradación de hialuronano. En algunos usos, la enzima de degradación de hialuronano se administra de 6 horas a 30 horas o de 12 horas a 24 horas, cada uno inclusive, antes de la administración del inhibidor de puntos de control inmunitario. El momento y el orden de administración se pueden determinar empíricamente, si es necesario, para los inhibidores de puntos de control inmunitario concretos.

Cualquiera de las combinaciones proporcionadas que se vaya a emplear se puede utilizar para tratar un cáncer que es un tumor, tal como un tumor que es un tumor sólido. En algunos ejemplos, el tumor se caracteriza por tener un contenido de hialuronano de moderado a alto, tal como un alto contenido de hialuronano. Los cánceres ilustrativos que se pueden tratar con las combinaciones proporcionadas para su uso incluyen, pero no se limitan a, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, mesotelioma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y cáncer de colon.

Las enzimas de degradación de hialuronano utilizadas en las combinaciones proporcionadas que se van a emplear pueden ser hialuronidasas solubles, que se formulan o modifican para aumentar la semi-vida en suero. Por ejemplo, la hialuronidasa puede ser una PH20 soluble, tal como la PH20 ovina o bovina o una forma truncada C-terminal de PH20 humana que carece de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal o una parte del sitio de anclaje de GPI, por lo que la forma truncada muestra actividad hialuronidasa y es soluble. Entre las enzimas de degradación de hialuronano PH20 humanas se encuentran las enzimas que son solubles, conservan la actividad de la hialuronidasa y tienen una secuencia contigua de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 217 que contiene los residuos de aminoácido 36-464 de SEQ ID NO: 217, y residuos hasta un residuo de aminoácido C-terminal, por lo que el polipéptido se trunca en el extremo C de manera que no incluye la longitud completa del polipéptido cuya secuencia se presenta como los aminoácidos 1-509 o 36-509 de SEQ ID NO: 217 o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia. En algunos ejemplos, la PH20 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia contigua de aminoácidos en SEQ ID NO: 217 que contiene los residuos de aminoácido 36-464 de SEQ ID NO: 217, y residuos hasta un residuo de aminoácido C-terminal, por lo que el polipéptido se trunca en el extremo C de manera que no incluye la longitud completa del polipéptido cuya secuencia se presenta como los aminoácidos 1-509 o 36-509 de SEQ ID NO: 217, que es soluble y conserva la actividad hialuronidasa. Los polipéptidos PH20 ilustrativos tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 85%, tal como al menos aproximadamente 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, de identidad de secuencia y conserva la actividad hialuronidasa.

La enzima de degradación de hialuronano para las combinaciones que se van a utilizar en la presente memoria se modifica con un polímero. En algunos ejemplos, el polímero es un polialquilenglicol, dextrano, pululano o celulosa. Los polímeros de polialquilenglicol, que pueden modificar la enzima de degradación de hialuronano, incluyen polietilenglicol (PEG) y metoxipolietilenglicol (mPEG). En los ejemplos en los que la enzima de degradación de hialuronano se modifica por PEG, el PEG puede ser ramificado o lineal. En cualquiera de los ejemplos, el polímero se puede producir por reacción con metoxi-poli(etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (5 kDa); metoxi-poli (etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (20 kDa); metoxi-poli (etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (30 kDa); metoxi-poli (etilenglicol)- α -metilbutanoato de succinimidilo (mPEG-SMB) (20 kDa); metoxi-poli (etilenglicol)- α -metilbutanoato de succinimidilo (mPEG-SMB) (30 kDa); metoxi-poli (etilenglicol) -butiraldehído (mPEG-butiraldehído) (30 kDa), metoxi-poli (etilenglicol)-propionato de succinimidilo (mPEG-SPA) (20 kDa); metoxi-poli (etilenglicol)-propionato de succinimidilo (mPEG-SPA) (30 kDa); (metoxi-poli (etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (10 kDa ramificada); (metoxi-poli (etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (20 kDa ramificada); (metoxi-poli (etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (40 kDa ramificada); (metoxi-poli (etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (60 kDa ramificada); biotin-poli (etilenglicol)- éster de N-hidroxisuccinimida (biotina-PEG-NHS) (5 kDa biotinilada); poli (etilenglicol)-carbonato de p-nitrofenilo (PEG-carbonato de p-nitrofenilo) (30 kDa); o poli (etilenglicol)-propionaldehído (PEG-propionaldehído) (30 kDa). En cualquiera de los ejemplos, el polímero puede ser un PEG que tiene un peso molecular de 30 o aproximadamente 30 kilodalton.

En cualquiera de los ejemplos de tratamiento del cáncer de la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano se puede administrar en un intervalo de dosificación de entre o aproximadamente entre 0,01 μ g/kg y 100 μ g/kg (peso corporal (PC) del sujeto), de 0,01 μ g/kg a 50 μ g/kg, de 0,01 μ g/kg a 15 μ g/kg, de 0,05 μ g/kg a 10 μ g/kg, de 0,75 μ g/kg a 7,5 μ g/kg, de 1,0 μ g/kg a 5,0 o de 1,0 μ g/kg a 3,0 μ g/kg o en un intervalo de dosificación de entre aproximadamente 0,1 y 5.000 Unidades/kg PC del sujeto, de 0,5 a 4.000 Unidades/kg, de 1 a 1.000 Unidades/kg, de 1 a 500 Unidades/kg, de 5 a 500 Unidades/kg, de 10 a 500 Unidades/kg o de 20 a 400 Unidades/kg de peso corporal (PC) del sujeto.

Alternativamente, las enzimas de degradación de hialuronano descritas anteriormente se pueden formular para su liberación sostenida, tal como en vesículas lipídicas, incluyendo liposomas y otros vehículos similares. Las vesículas pueden estar dirigidas al suministro de células seleccionadas, tales como linfocitos y/o células tumorales, dependiendo del inhibidor de puntos de control utilizado combinado con las mismas. El inhibidor de puntos de control se puede formular con la enzima de degradación de hialuronano. La enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, como se describe en la presente memoria, puede estar codificada en un vector, tal como un vector oncolítico para el suministro a tumores y la expresión en los mismos o puede ser dirigida para el suministro a otras células y tejidos; el inhibidor de puntos de control, si es una proteína, también puede estar codificada en el vector para su expresión.

En cualquiera de las combinaciones para su uso en el tratamiento del cáncer proporcionado en la presente memoria, el inhibidor de puntos de control inmunitario administrado bloquea la actividad de una proteína de puntos de control inmunitario, en donde la proteína de puntos de control inmunitario es cualquiera de CTLA4, PD-1 y PD-L1, y el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo o un fragmento de unión a proteínas de puntos de control inmunitario del mismo.

Un anticuerpo contra la proteína de puntos de control autoinmunitario ilustrativo es un anticuerpo anti-PD-L1, derivados del mismo, y fragmentos de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos contra PD-L1 ilustrativos incluyen BMS-936559, derivados de los mismos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 92 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 94, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 92 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 94.

Los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos también incluyen MEDI4736, derivados del mismo, y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 102 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 104, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 102 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 104; y

Los anticuerpos contra PD-L1 ilustrativos también incluyen MPDL3280A, derivados del mismo, y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 114 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 115, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 114 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 115.

Un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario ilustrativo es un anticuerpo anti-CTLA4, derivados del mismo, y fragmentos de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos anti-CTLA4 ilustrativos incluyen, por ejemplo, Ipilimumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 y un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 24; o una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 24.

Los anticuerpos anti-CTLA4 ilustrativos también incluyen Tremelimumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 34 y un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos indicados en SEQ ID NO: 36 o una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 36.

Otro anticuerpo contra proteína de puntos de control inmunitario ilustrativo es un anticuerpo anti-PD-1, derivados del mismo, y fragmentos de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos anti-PD-1 ilustrativos incluyen Nivolumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 54 y un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 56 o una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 54 y una cadena ligera variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 56.

Los anticuerpos anti-PD-1 ilustrativos también incluyen MK-3475, derivados del mismo, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 68 y un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 68 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO ID NO: 70.

Los anticuerpos anti-PD-1 ilustrativos también incluyen Pidilizumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 82 y un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 84, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92% , 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 82 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 84.

Los intervalos de dosificación para los inhibidores de puntos de control inmunitario y cualquier otro inhibidor de los efectos inmunosupresores de los tumores pueden ser los conocidos por los expertos en la técnica o se pueden determinar empíricamente para la terapia combinada. En virtud de cualquier aumento en la eficacia de los inhibidores de puntos de control inmunitario y otros inhibidores de la supresión inmunitaria, la dosificación puede ser menor. De manera similar, las dosificaciones de la enzima de degradación de hialuronano y los inhibidores de hialuronano pueden ser aquellas dosis conocidas por los expertos en la técnica. Las dosificaciones ilustrativas en modelos animales se describen en los ejemplos. Los expertos en la técnica pueden extrapolar o predecir las dosificaciones en seres humanos a partir de modelos animales (véase, p. ej., Huang et al. (2014) The application of allometric scaling principles to predict pharmacokinetic parameters across species, Expert Opin Drug Metab Toxicol. 10:1241-53). Por ejemplo, una dosificación equivalente en seres humanos de PEGPH20 utilizada en los ejemplos en la presente memoria en el modelo de roedor es de 37,5 µg/kg. La dosificación en seres humanos es de 3 µg/kg. Por lo tanto, en algunas realizaciones, cuando la enzima de degradación de hialuronano es PEGPH20, la dosificación en seres humanos para la administración con un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-PD-L1, es o es de aproximadamente 1-10 µg/kg, tal como 2 -4 µg/kg, y particularmente 3 µg/kg. Se entiende que la dosificación dependerá del sujeto, el régimen de tratamiento, del agente particular, de la cantidad de efectos secundarios tolerados, de los agentes adicionales administrados que contrarrestan los efectos secundarios y de otros parámetros similares. El experto en la técnica puede, a la vista de la descripción de la presente memoria, seleccionar las dosificaciones apropiadas de cada agente.

Por ejemplo, el inhibidor de puntos de control inmunitario se puede administrar en un intervalo de dosificación que está entre o aproximadamente entre 0,1 mg por kg de peso corporal (mg/kg de peso corporal) y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg PC, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg PC, de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 10 mg/kg de PC, de aproximadamente 0,5 mg/kg a 5 mg/kg PC o de 0,5 mg/kg a 1 mg/kg PC. Las dosis ilustrativas de un inhibidor de puntos de control inmunitario incluyen una dosis que es al menos o es al menos aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23 mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg o 50 mg/kg de peso corporal (PC) del sujeto a tratar.

En cualquiera de las combinaciones o combinaciones para su uso en el tratamiento proporcionado en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano se puede administrar a cualquier frecuencia adecuada, tal como, por ejemplo, la frecuencia de una vez al día, una vez cada dos días, dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas o una vez cada 4 semanas; y el inhibidor de puntos de control inmunitario se puede administrar a la misma frecuencia que la enzima de degradación de hialuronano o a una frecuencia diferente, en donde cada administración del inhibidor de puntos de control inmunitario está precedida por una administración de enzima de degradación de hialuronano por no más de 48 horas. Por ejemplo, el inhibidor de puntos de control inmunitario se puede administrar dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 2 meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, o una vez cada 6 meses; en donde cada administración del inhibidor de puntos de control inmunitario está precedida por una administración de enzima de degradación de hialuronano en no más de 48 horas.

Un régimen de dosificación ilustrativo que se puede emplear implica la administración de la enzima de degradación de hialuronano dos veces por semana, mientras que el inhibidor de puntos de control inmunitario se administra no

más de una vez a la semana, donde cada administración del inhibidor de puntos de control inmunitario está precedida por una administración de enzima de degradación de hialuronano en no más de 48 horas. Por ejemplo, el inhibidor de puntos de control inmunitario se puede administrar no más de una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, mientras que la enzima de degradación de hialuronano se administra dos veces por semana.

En otros ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano se administra dos veces por semana y el inhibidor de puntos de control inmunitario se administra dos veces por semana, en donde cada administración del inhibidor de puntos de control inmunitario está precedida por una administración de enzima de degradación de hialuronano en no más de 48 horas. En algunos ejemplos, cada administración del inhibidor de puntos de control inmunitario está precedida por una administración de la enzima de degradación de hialuronano en no más de 24 horas.

En la presente memoria también se proporcionan combinaciones de acuerdo con las presentes reivindicaciones para su uso en el tratamiento de un cáncer que incluye adicionalmente la administración de un corticosteroide, tal como un glucocorticoide. El glucocorticoide se puede seleccionar entre cortisonas, dexametasonas, hidrocloronas, metilprednisolonas, prednisolonas y prednisonas. En cualquiera de los ejemplos, el corticosteroide se puede administrar antes, concurrentemente, intermitentemente o después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano. En algunos ejemplos, el corticosteroide se administra antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano y después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano. En otros ejemplos, el corticosteroide se coadministra con la enzima de degradación de hialuronano. En algunos ejemplos, el corticosteroide, tal como un glucocorticoide, se puede administrar, por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 1 hora antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, o al menos 8 horas a 12 horas después de la administración del agente anti-hialuronano. En cualquiera de los ejemplos, el corticosteroide se puede administrar en una cantidad que está entre aproximadamente 0,1 y 20 mg, de 0,1 a 15 mg, de 0,1 a 10 mg, de 0,1 a 5 mg, de 0,2 a 20 mg, de 0,2 a 15 mg, de 0,2 a 10 mg, de 0,2 a 5 mg, de 0,4 a 20 mg, de 0,4 a 15 mg, de 0,4 a 10 mg, de 0,4 a 5 mg, de 0,4 a 4 mg, de 1 a 20 mg, de 1 a 15 mg o de 1 a 10 mg. En cualquiera de los métodos proporcionados, el corticosteroide se puede administrar por vía oral.

En la presente memoria también se proporcionan combinaciones de acuerdo con las presentes reivindicaciones que incluyen una primera composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano formulada o modificada para tener una mayor semi-vida en suero en comparación con la enzima de degradación de hialuronano sola; y una segunda composición que contiene un inhibidor de puntos de control inmunitario u otro inhibidor de la supresión inmunitaria. La enzima de degradación de hialuronano puede estar conjugada con polímeros o puede estar formulada para una liberación prolongada, por ejemplo, en o asociada con una vesícula, tal como un liposoma o micela o vesícula multilaminar o una vesícula multilamelar, o codificada en un vector, tal como un vector de terapia génica o un vector oncolítico para el suministro a una célula tumoral.

En la presente memoria se proporcionan combinaciones de acuerdo con las presentes reivindicaciones que incluyen una primera composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y una segunda composición que contiene un inhibidor de puntos de control inmunitario. En cualquiera de las combinaciones proporcionadas, la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa, tal como una PH20 o una forma troncada de la misma que carece de un sitio de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal o una parte del sitio de anclaje a GPI. En cualquiera de las combinaciones proporcionadas, la enzima de degradación de hialuronano puede ser una PH20 humana o no humana. Entre las enzimas de degradación de hialuronano PH20 humanas se encuentran enzimas que son solubles, conservan la actividad de la hialuronidasa y tienen una secuencia contigua de aminoácidos de SEQ ID NO: 217 que contiene los residuos de aminoácido 36-464 de SEQ ID NO: 217, y los residuos hasta un residuo de aminoácido C-terminal, por lo que el polipéptido se trunca en el extremo C de manera que no incluye la longitud completa del polipéptido cuya secuencia se presenta como los aminoácidos 1-509 o 36-509 de SEQ ID NO: 217 o tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 85% con la misma. En algunos ejemplos, la PH20 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia contigua de aminoácidos en SEQ ID NO: 217 que contiene los residuos de aminoácido 36-464 de SEQ ID NO: 217, y residuos hasta un residuo de aminoácido C-terminal, por lo que el polipéptido se trunca en el extremo C de manera que no incluye la longitud completa del polipéptido cuya secuencia se presenta como los aminoácidos 1-509 o 36-509 de SEQ ID NO: 217, que es soluble y conserva la actividad hialuronidasa. Los polipéptidos PH20 ilustrativos tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 85%, tal como al menos aproximadamente 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia y conserva la actividad hialuronidasa.

La enzima de degradación de hialuronano proporcionada en las combinaciones de la presente memoria se modifica con un polímero. En algunos ejemplos, el polímero es un polialquilenglicol, dextrano, pululano o celulosa. Los polímeros de polialquilenglicol, que pueden modificar la enzima de degradación de hialuronano, incluyen polietilenglicol (PEG) y metoxipolietilenglicol (mPEG). En los ejemplos en los que la enzima de degradación de hialuronano se modifica mediante PEG, el PEG puede ser ramificado o lineal. En cualquiera de los ejemplos, el polímero se puede producir por reacción con succinimidil butanoato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SBA) (5 kDa);

succinimidil butanoato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SBA) (20 kDa); succinimidil butanoato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SBA) (30 kDa); succinimidil α -metilbutanoato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SMB) (20 kDa); succinimidil α -metilbutanoato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SMB) (30 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butiraldehído (mPEG-butiraldehído) (30 kDa), succinimidil propionato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SPA) (20 kDa); succinimidil propionato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SPA) (30 kDa); éster de N-hidroxisuccinimida de (metoxi-poli(etilenglicol))₂ (mPEG₂-NHS) (10 kDa ramificado); éster de N-hidroxisuccinimida de (metoxi-poli(etilenglicol))₂ (mPEG₂-NHS) (20 kDa ramificado); éster de N-hidroxisuccinimida de (metoxi-poli(etilenglicol))₂ (mPEG₂-NHS) (40 kDa ramificado); éster de N-hidroxisuccinimida de (metoxi-poli(etilenglicol))₂ (mPEG₂-NHS) (60 kDa ramificado); éster de N-hidroxisuccinimida de biotina-poli(etilenglicol) (biotina-PEG-NHS) (5 kDa biotinilado); p-nitrofenil carbonato de poli(etilenglicol) (p-nitrofenil carbonato de PEG) (30 kDa); o poli(etilenglicol)-propionaldehído (PEG-propionaldehído) (30 kDa). En cualquiera de los ejemplos, el polímero puede ser un PEG que tiene un peso molecular de 30 o aproximadamente 30 kilodalton.

La composición de la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, en cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria, puede contener una cantidad de enzima de degradación de hialuronano que está en una cantidad dentro del intervalo entre o entre aproximadamente 0,1 μ g/mL y 100 μ g/mL, de 1 μ g/mL a 50 μ g/mL o de 1 μ g/mL a 20 μ g/mL de enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero o una cantidad de enzima de degradación de hialuronano dentro del intervalo de aproximadamente 10 U/mL a 5.000 U/mL, de 50 U/mL a 4.000 U/mL, de 100 U/mL a 2.000 U/mL, de 300 U/mL a 2.000 U/mL, de 600 U/mL a 2.000 U/mL o de 100 U/mL a 1.000 U/mL de enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero. Los volúmenes no limitantes de la composición de la enzima de degradación de hialuronano en el método proporcionado incluyen intervalos de aproximadamente 0,5 mL a 50 mL, de 1 mL a 10 mL o de 1 mL a 5 mL.

Las combinaciones proporcionadas también incluyen una composición que contiene un inhibidor de puntos de control inmunitario. La diana del inhibidor de puntos de control inmunitario es una proteína de puntos de control inmunitario seleccionada entre CTLA4, PD-1 y PD-L1.

El inhibidor de la proteína de puntos de control inmunitario, en las combinaciones proporcionadas, es un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario ilustrativo, en las combinaciones proporcionadas, es un anticuerpo anti-CTLA4, derivados del mismo, y fragmentos de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos anti-CTLA4 ilustrativos incluyen Ipilimumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 y un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 24; o una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 24.

Los anticuerpos anti-CTLA4 ilustrativos, en las combinaciones proporcionadas, también incluyen Tremelimumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 36 o una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 36.

Otro anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario ilustrativo, en las combinaciones proporcionadas, es un anticuerpo anti-PD-1, derivados del mismo, y fragmentos de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos PD-1 ilustrativos incluyen Nivolumab, derivados del mismo, y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 54 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 56 o una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 54 y una cadena ligera variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 56.

Los anticuerpos anti-PD-1 ilustrativos, en las combinaciones proporcionadas, también incluyen MK-3475, derivados del mismo, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 68 y un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia

de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 68 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia identidad de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 70.

5 Los anticuerpos anti-PD-1 ilustrativos, en las combinaciones proporcionadas, también incluyen Pidilizumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 82 y un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 84, o una cadena pesada variable que tiene una
10 identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% , 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 82 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 84.

15 Otro anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario ilustrativo es un anticuerpo anti-PD-L1, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos PD-L1 ilustrativos incluyen BMS-936559, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 92 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 94, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de
20 secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92% , 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 92 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 94.

25 Los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos, en las combinaciones proporcionadas, también incluyen MEDI4736, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 102 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 104, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%
30 o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 102 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 104.

35 Los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos, en las combinaciones proporcionadas, también incluyen MPDL3280A, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 114 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 115, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%
40 o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 114 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia identidad de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 115.

En cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria, el inhibidor de puntos de control inmunitario en la composición se puede proporcionar en una cantidad que se selecciona entre o aproximadamente
45 entre 0,5 mg/mL y 50 mg/mL, de 1 mg/mL a 10 mg/mL o de 2 mg/mL a 6 mg/mL. El inhibidor de puntos de control inmunitario también se puede proporcionar en la combinación en una cantidad que sea al menos o aproximadamente al menos 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL o 10 mg/mL. La composición que contiene el inhibidor de puntos de control inmunitario se puede proporcionar en un volumen que es de o de aproximadamente 0,5 mL a 500 mL, de 1 mL a 50 mL o de 10 mL a 40
50 mL. En algunos ejemplos, la composición del inhibidor de puntos de control inmunitario se proporciona en un volumen de al menos o al menos aproximadamente 1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL o 100 mL.

55 Cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria puede contener adicionalmente un corticosteroide además de las composiciones de enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero e inhibidor de puntos de control inmunitario. Un corticosteroide ilustrativo que se puede incluir en las combinaciones proporcionadas incluye un glucocorticoide. Los glucocorticoides ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, cortisonas, dexametasonas, hidrocortisonas, metilprednisolonas, prednisolonas y prednisonas.

60 En la presente memoria también se proporcionan combinaciones, tales como combinaciones farmacéuticas, para su uso en el tratamiento de un cáncer. Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan combinaciones para su uso en el tratamiento de un cáncer en un animal, en donde el animal se expone primero a la enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero y a continuación se pone en contacto con el inhibidor de puntos de control inmunitario. También se describen los usos de cualquiera de las combinaciones proporcionadas para la

preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un animal, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitario y la enzima de degradación de hialuronano están cada uno en una forma farmacéuticamente aceptable, y el animal, tal como un ser humano, está expuesto a la enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero u otra forma de enzima de degradación de hialuronano que presenta un incremento de la semi-vida en suero, y también se pone en contacto con el inhibidor de puntos de control inmunitario. La enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, se puede administrar con el inhibidor de puntos de control, antes del inhibidor de puntos de control, intermitentemente con el mismo o secuencialmente. En algunas realizaciones, el animal, tal como un ser humano, se expone primero a la enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero y a continuación se pone en contacto con el inhibidor de puntos de control inmunitario.

En cualquiera de las combinaciones proporcionadas o combinaciones para su uso, la enzima de degradación de hialuronano y el inhibidor de puntos de control inmunitario se pueden formular para la administración por la misma vía de administración o por diferentes vías de administración. En algunos ejemplos de las combinaciones proporcionadas y las combinaciones para su uso, la enzima de degradación de hialuronano y el inhibidor de puntos de control inmunitario se administran por la misma vía de administración. Por ejemplo, en cualquiera de las combinaciones proporcionadas o combinaciones para su uso, la enzima de degradación de hialuronano y el inhibidor de puntos de control inmunitario están formulados para administración oral, intravenosa (IV), subcutánea, intramuscular, intratumoral, intradérmica, tópica, transdérmica, rectal, intratecal o sub-epidérmica. En ejemplos particulares, la enzima de degradación de hialuronano y el inhibidor de puntos de control inmunitario están formulados para la administración sistémica, tal como la administración intravenosa.

En cualquiera de las combinaciones proporcionadas o combinaciones para su uso, la enzima de degradación de hialuronano se puede exponer al animal hasta 48 horas antes de que el inhibidor de puntos de control inmunitario se exponga al animal, tal como al menos o al menos aproximadamente 5 minutos, minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas, o 48 horas antes de que el inhibidor de puntos de control inmunitario se exponga al animal, por lo que la enzima de degradación de hialuronano se formula para su administración al menos 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas antes del inhibidor de puntos de control inmunitario.

Cualquiera de las combinaciones o combinaciones para su uso en el tratamiento de un cáncer proporcionado en la presente memoria puede ser para tratar un cáncer que es un tumor, tal como un tumor sólido. Las combinaciones para su uso también se pueden utilizar para el tratamiento de otros cánceres en los que el hialuronano desempeña un papel. Por ejemplo, el hialuronano (HA), un componente importante de la progresión del cáncer, se sintetiza mediante las hialuronano sintasas (HAS). En las células cancerosas, el pre-ARNm de hialuronano sintasa 1 (HAS1) se empalma de manera anormal para generar una familia de variantes de empalme aberrantes (HASIV), que se producen casi exclusivamente en células malignas y que sintetizan HA extracelular e intracelular. La expresión de los HASIV aberrantes pronostica una mala supervivencia, por ejemplo, en el mieloma múltiple (véase, por ejemplo, Adamia et al. (2014) Adv. Cancer Res. 123: 67-94). La HA extracelular puede participar en la diseminación maligna; y la HA intracelular puede desempeñar un papel en la oncogénesis (véase p. ej., Adamia et al. (2014) Adv. Cancer Res. 123: 61-94). En ejemplos particulares, el tumor se caracteriza por tener un contenido de hialuronano de moderado a alto, tal como un alto contenido de hialuronano. Los ejemplos no limitantes de cánceres que van a ser tratados por las combinaciones y combinaciones para su uso en la presente memoria incluyen cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, mesotelioma, CPCNP y cáncer de colon.

En la presente memoria también se proporcionan inhibidores de puntos de control inmunitario para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto de acuerdo con las presentes reivindicaciones, en donde el sujeto ha sido tratado con una enzima de degradación de hialuronano, y la enzima de degradación de hialuronano se conjuga con un polímero. En tales inhibidores de puntos de control inmunitario para su uso, el inhibidor de puntos de control inmunitario puede bloquear la actividad de una proteína de puntos de control inmunitario. Las dianas del inhibidor de puntos de control inmunitario, para los inhibidores de puntos de control inmunitario proporcionados para su uso, son CTLA4, PD-1 y PD-L1. Los inhibidores de puntos de control inmunitario proporcionados para su uso en el tratamiento del cáncer incluyen inhibidores de la proteína de puntos de control inmunitario seleccionados de entre los anticuerpos, y fragmentos de unión a la proteína de puntos de control inmunitario. En ejemplos particulares, el inhibidor de la proteína de puntos de control inmunitario proporcionado para su uso incluye un inhibidor de puntos de control inmunitario que es un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los inhibidores de puntos de control inmunitario proporcionados para su uso incluyen un anticuerpo anti- proteína de puntos de control inmunitario que es un anticuerpo anti-CTLA4, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de anticuerpos anti-CTLA4 incluyen Ipilimumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 y un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 24; o una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que

tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 24.

5 Los anticuerpos anti-CTLA4 ilustrativos también incluyen Tremelimumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 34 y un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos indicados en
10 SEQ ID NO: 36 o una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 36.

15 Los inhibidores de puntos de control inmunitario proporcionados para su uso también incluyen un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario que es un anticuerpo anti-PD-L1, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos contra PD-L1 ilustrativos incluyen BMS-936559, derivados del mismos y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 92 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la
20 secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 94, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 92 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 94.

25 Los anticuerpos contra PD-L1 ilustrativos también incluyen MEDI4736, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 102 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 104, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos
30 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 102 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 104.

35 Los anticuerpos contra PD-L1 ilustrativos también incluyen MPDL3280A, derivados del mismo, y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 114 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 115, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena
40 pesada expuesta en SEQ ID NO: 114 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 115.

45 Los inhibidores de puntos de control inmunitario proporcionados para su uso también incluyen un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario que es un anticuerpo anti-PD-1, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 incluyen Nivolumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 54 y un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de los aminoácidos establecidos en SEQ ID NO: 56 o una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 54 y una cadena ligera variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 56.
50

55 Los anticuerpos anti-PD-1 ilustrativos también incluyen MK-3475, derivados del mismo, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 68 y un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 68 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO ID NO: 70.
60

Los anticuerpos anti-PD-1 ilustrativos también incluyen Pidilizumab, derivados del mismo y fragmentos de unión a antígeno del mismo que tienen un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos

expuesta en SEQ ID NO: 82 y un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 84, o una cadena pesada variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 82 y una cadena ligera variable que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 84.

Los inhibidores de puntos de control inmunitario proporcionados para su uso incluyen un inhibidor de la proteína de puntos de control inmunitario que está formulado para la administración a una concentración seleccionada entre o aproximadamente entre 0,5 mg/mL y 50 mg/mL, de 1 mg/mL a 10 mg/mL o de 2 mg/mL a 6 mg/mL; y al menos 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL o 10 mg/mL. Tales formulaciones pueden incluir el inhibidor de puntos de control inmunitario en un volumen que es de o de aproximadamente 0,5 mL a 500 mL, de 1 mL a 50 mL, o de 10 mL a 40 mL; o al menos 1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL o 100 mL.

En cualquiera de los inhibidores de puntos de control inmunitario proporcionados para su uso, el sujeto está expuesto a una enzima de degradación del hialuronano. La enzima de degradación de hialuronano puede ser una hialuronidasa, tal como una PH20 o una forma truncada de la misma que carece de un sitio de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) C terminal o una parte del sitio de unión de GPI. Dicha PH20 puede ser una PH20 humana o no humana. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano puede ser una PH20 truncada C terminal que tiene una secuencia contigua de aminoácidos de SEQ ID NO: 217 que contiene los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 217 y residuos hasta un residuo de aminoácido C terminal, por lo que el polipéptido se trunca en el extremo C de manera que no incluye la longitud completa del polipéptido cuya secuencia se presenta como los aminoácidos 1-509 o 36-509 de SEQ ID NO: 217 o una variante del mismo que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con esta, que es soluble y conserva la actividad hialuronidasa. En algunos ejemplos, la variante de PH20 puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 217 que contiene los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 217 y residuos hasta un residuo de aminoácido C-terminal, por lo que el polipéptido se trunca en el extremo C de manera que no incluye la longitud completa del polipéptido cuya secuencia se presenta como los aminoácidos 1-509 o 36-509 de SEQ ID NO: 217, siempre que sea soluble y conserve la actividad hialuronidasa. Los ejemplos de tales enzimas PH20 incluyen cualquier PH20 que tenga una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158, o una secuencia de aminoácidos que muestre al menos 85% de identidad de secuencia, tal como al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158 y conserve la actividad hialuronidasa.

Los inhibidores de puntos de control inmunitario proporcionados para su uso en el tratamiento del cáncer incluyen una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímeros. Los polímeros ilustrativos no limitantes que se pueden conjugar con la enzima son polialquilenglicol, dextrano, pululano y celulosa. En algunos ejemplos, el polímero es un polialquilenglicol, seleccionado entre polietilenglicol (PEG) y metoxipolietilenglicol (mPEG), en el que el PEG es un PEG lineal o ramificado. El polímero que se conjuga con la enzima de degradación de hialuronano se puede producir por reacción con succinimidil butanoato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SBA) (5 kDa); succinimidil butanoato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SBA) (20 kDa); succinimidil butanoato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SBA) (30 kDa); succinimidil α -metilbutanoato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SMB) (20 kDa); succinimidil α -metilbutanoato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SMB) (30 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butiraldehído (mPEG-butiraldehído) (30 kDa), succinimidil propionato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SPA) (20 kDa); succinimidil propionato de metoxi-poli(etilenglicol) (mPEG-SPA) (30 kDa); éster de N-hidroxisuccinimida de (metoxi-poli(etilenglicol))₂ (mPEG₂-NHS) (10 kDa ramificado); éster de N-hidroxisuccinimida de (metoxi-poli(etilenglicol))₂ (mPEG₂-NHS) (20 kDa ramificado); éster de N-hidroxisuccinimida de (metoxi-poli(etilenglicol))₂ (mPEG₂-NHS) (40 kDa ramificado); éster de N-hidroxisuccinimida de (metoxi-poli(etilenglicol))₂ (mPEG₂-NHS) (60 kDa ramificado); éster de N-hidroxisuccinimida de biotina-poli(etilenglicol) (biotina-PEG-NHS) (5 kDa biotinilado); p-nitrofenil carbonato de poli(etilenglicol) (p-nitrofenil carbonato de PEG) (30 kDa); o poli(etilenglicol)-propionaldehído (PEG-propionaldehído) (30 kDa). En cualquiera de los ejemplos, el polímero puede ser un PEG que tiene un peso molecular de 30 o aproximadamente 30 kilodalton.

El inhibidor de puntos de control inmunitario proporcionado para su uso en el tratamiento del cáncer se puede formular para administración oral, intravenosa (IV), subcutánea, intramuscular, intratumoral, intradérmica, tópica, transdérmica, rectal, intratecal o subepidérmica. En ejemplos particulares, el inhibidor de puntos de control inmunitario para su uso está formulado para administración sistémica, tal como la administración intravenosa. El inhibidor de puntos de control inmunitario proporcionado se puede formular para su uso hasta 48 horas después de que el sujeto haya sido tratado con la enzima de degradación de hialuronano, tal como al menos o al menos aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas después de que el sujeto sea tratado con la enzima de degradación de hialuronano.

El cáncer tratado por cualquiera de los inhibidores de puntos de control inmunitario puede ser un tumor, tal como un tumor sólido. En ejemplos particulares, el tumor se caracteriza por tener un contenido de hialuronano de moderado a alto, tal como un alto contenido de hialuronano. Los cánceres ilustrativos tratados con los inhibidores de puntos de control inmunitario incluyen, pero no se limitan a, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, mesotelioma, CPNM y cáncer de colon.

Descripción detallada

Esquema

A. Definiciones

B. Terapia combinada de puntos de control inmunitario y enzima de degradación de hialuronano

1. Tumores sólidos y respuesta inmunitaria

2. Modulación de puntos de control inmunitario de la actividad de células T en tumores

a. CTLA-4 y cebado de células T

b. PD-1 y fase efectora de células T

c. Otros agentes inmunomoduladores (p. ej., LAG-3)

3. Enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero en terapia combinada con un inhibidor de puntos de control inmunitario

C. Agentes de terapia combinada

1. Inhibidores de puntos de control inmunitarios y formulaciones de los mismos

a. Terapias anti-CTLA-4

(i) Ipilimumab y derivados del mismo

(ii) Tremelimumab y derivados del mismo

b. Terapias anti-PD-1 y anti PD-1-L

(i) Anticuerpos anti-PD-1

(a) Nivolumab y derivados del mismo.

(b) MK-3475 y derivados del mismo.

(c) Pidilizumab y derivados del mismo.

(ii) Anticuerpos anti-PD-L1

(a) BMS-936559 y derivados del mismo.

(b) MPDL3280A y derivados del mismo.

(c) MEDI4736 y derivados del mismo.

c. Otras terapias inmunomoduladoras

2. Enzimas de degradación de hialuronano y enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímero

a. Hialuronidasas

i. Hialuronidasas PH20 de tipo mamífero

ii. Hialuronidasa bacteriana

iii. Hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos

b. Otras enzimas de degradación de hialuronano

	c. Enzimas de degradación de hialuronano solubles
	i. PH20 soluble humana
5	ii. rHuPH20
	d. Glicosilación de enzimas de degradación de hialuronano
10	e. Formulaciones de liberación sostenida o controlada y vectores que codifican hialuronidasas solubles
	i. Enzimas de degradación de hialuronano modificadas (conjugadas con polímeros)
15	Enzimas de degradación de hialuronano solubles PEGiladas
	ii. Formulaciones de liberación sostenida o controlada y vectores que codifican hialuronidasas solubles
20	a) Liposomas multivesiculares (MVL)
	b) Co-Formulaciones con MVL
	D. Métodos para producir ácidos nucleicos y polipéptidos codificados de enzimas de degradación de hialuronano e inhibidores de puntos de control inmunitario (p. ej., anticuerpos)
25	1. Aislamiento o preparación de polipéptidos que codifican ácido nucleico
	a. Enzima de degradación de hialuronano
30	b. Inhibidor de puntos de control inmunitarios (p. ej., anticuerpos)
	2. Vectores
	3. Células y expresión
35	a. Células procariotas
	b. Células de levadura
40	c. Células de insectos
	d. Células de mamífero
	e. Plantas
45	4. Técnicas de purificación
	5. PEGilación de polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano
50	E. Composiciones y formulaciones farmacéuticas
	1. Formulaciones
	a. Inyectables, soluciones y emulsiones.
55	b. Polvos liofilizados
	c. Composiciones para otras vías de administración
60	2. Cantidades de formulación
	a. Formulaciones de enzimas que degradan el hialuronano
	b. Formulaciones de inhibidores de puntos de control

3. Empaquetamiento y artículos de manufactura**F. Métodos de seguimiento y evaluación de la actividad, biodisponibilidad y farmacocinética****1. Actividad hialuronidasa****2. Actividad del inhibidor de puntos de control inmunitario****3. Actividad anticancerosa de la terapia combinada****a. Crecimiento y volumen del tumor****b. Presencia de marcadores tumorales****c. Seguimiento inmunológico****(i) Frecuencia de tipos celulares específicos en sangre periférica****(ii) Detección de marcadores de células inmunitarias****(iii) Respuestas inmunitarias específicas de antígeno****4. Ensayos farmacocinéticos y farmacodinámicos****G. Métodos y usos de la terapia combinada****1. Cánceres****2. Selección de sujetos para tratamiento****a. Medición del contenido de hialuronano en tumores****(i) Proteína de unión a hialuronano (HABP)****(ii) Métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos****(iii) Ensayos de unión en fase sólida****(iv) Ensayos de imagen *in vivo*****b. Recuento de linfocitos pre-tratamiento****2. Dosificación y administración****3. Régimen de dosificación: frecuencia y ciclo de administración****4. Terapia combinada adicional****a. Corticosteroide****b. Agentes anticancerosos y otros tratamientos****H. Ejemplos****A. Definiciones**

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos de la presente memoria, prevalecerán 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 concreta en Internet puede ir y venir, pero se puede encontrar información equivalente buscando en Internet. La referencia a esto evidencia la disponibilidad y difusión pública de semejante información.

Como se emplea en la presente memoria, "terapia combinada" se refiere a un tratamiento en el que a un sujeto se le administran dos o más agentes terapéuticos, como al menos dos o al menos tres agentes terapéuticos, para tratar

una sola enfermedad. Para los fines de la presente memoria, la terapia combinada incluye la terapia con una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y un agente bloqueador de la proteína de puntos de control inmunitario.

5 Como se emplea en la presente memoria, "puntos de control inmunitario" se refiere a las vías inhibitoras del sistema inmunológico que son responsables de mantener la tolerancia y modular la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas en los tejidos periféricos para minimizar el daño colateral en los tejidos. Los puntos de control inmunitarios están regulados por proteínas de puntos de control inmunitarios.

10 Como se emplea en la presente memoria, una "proteína de puntos de control inmunitario" es una proteína, típicamente un receptor (p. ej., CTLA4 o PD-1) o un ligando (p. ej., PD-L1) que regula o modula el alcance de una respuesta inmunitaria. Las proteínas de puntos de control inmunitario pueden ser inhibitoras o estimuladoras. En particular, las proteínas de puntos de control inmunitario son inhibitoras de la activación de la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, la inhibición de una proteína de puntos de control inmunitario inhibidora actúa para estimular o activar
15 una respuesta inmunitaria, tal como la activación y proliferación de células T.

Como se emplean en la presente memoria, un "inhibidor de puntos de control inmunitario" o "agente inhibidor de puntos de control inmunitario" o "agente bloqueador de puntos de control inmunitario" se refieren a un agente que se une a una proteína de puntos de control inmunitario inhibidora y bloquea su actividad. La inhibición puede ser
20 competitiva o no competitiva, que puede ser estérica o alostérica. En los casos en los que una proteína de puntos de control inmunitario es una proteína estimuladora inmunitaria, un inhibidor de puntos de control inmunitario actúa para promover la actividad de la proteína estimuladora inmunitaria, por ejemplo uniendo y activando la proteína de puntos de control inmunitario estimuladora o inhibiendo por interferencia, por ejemplo uniéndose o desactivando, los inhibidores de la proteína de puntos de control inmunitario estimuladora. Un ejemplo de un inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario.
25

Una "diana" de un inhibidor de puntos de control inmunitario es la proteína de puntos de control inmunitario a la que se une el inhibidor de puntos de control inmunitario o el agente inhibidor de puntos de control inmunitario para bloquear la actividad. Normalmente, el inhibidor de puntos de control inmunitario se une específicamente a la diana. Por ejemplo, la diana del anticuerpo anti-CTLA4 ilustrativo designado ipilimumab es CTLA4.
30

Como se emplea en la presente memoria, "anticuerpo" se refiere a inmunoglobulinas y fragmentos de inmunoglobulina, ya sean naturales o parcial o totalmente sintéticos, tales como los producidos de forma recombinante, incluyendo cualquier fragmento de los mismos que contenga al menos una porción de la cadena pesada variable y la región de la cadena ligera de la molécula de inmunoglobulina que sea suficiente para formar un sitio de unión al antígeno y, cuando se ensambla, para unirse específicamente al antígeno. Por lo tanto, un anticuerpo incluye cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o sustancialmente homólogo a un dominio de unión a antígeno de inmunoglobulina (sitio de combinación con anticuerpos). Por ejemplo, un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que contiene dos cadenas pesadas (que se pueden designar H y H') y dos cadenas ligeras (que se pueden designar L y L'), donde cada cadena pesada puede ser una cadena pesada de inmunoglobulina completa o una porción de la misma suficiente para formar un sitio de unión a antígeno (p. ej., las cadenas pesadas incluyen, pero no se limitan a, cadenas V_H, cadenas V_H-C_{H1} y cadenas V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}), y cada cadena ligera puede ser una cadena ligera completa o una porción de la misma suficiente para formar un sitio de unión a antígeno (p. ej., las cadenas ligeras incluyen, pero no se limitan a, cadenas V_L y cadenas V_L-C_L). Cada
45 cadena pesada (H y H') se empareja con una cadena ligera (L y L', respectivamente). Típicamente, los anticuerpos incluyen mínimamente toda o al menos una porción de la cadena variable pesada (V_H) y/o la cadena ligera variable (V_L). El anticuerpo también puede incluir toda o una porción de la región constante.

Para los fines de la presente memoria, el término anticuerpo incluye anticuerpos completos y porciones de los mismos que incluyen fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, Fv unidos por disulfuro (dsFv), fragmentos Fd, fragmentos Fd', Fv de cadena sencilla (scFv), Fab de cadena sencilla (scFab), diacuerpos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) o fragmentos de unión a antígenos de cualquiera de los anteriores. El anticuerpo también incluye anticuerpos sintéticos, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos no humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos e intracuerpos. Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria incluyen miembros de cualquier tipo de inmunoglobulina (p. ej., IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY), cualquier clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase (p. ej., IgG2a e IgG2b).
50

60 Como se emplea en la presente memoria, una forma de un anticuerpo se refiere a una estructura particular de un anticuerpo. Los anticuerpos en la presente memoria incluyen anticuerpos completos y porciones de los mismos, tales como, por ejemplo, un fragmento Fab u otro fragmento de anticuerpo. Por lo tanto, un Fab es una forma concreta de un anticuerpo.

Como se emplea en la presente memoria, la referencia a una "forma correspondiente" de un anticuerpo significa que

al comparar una propiedad o actividad de dos anticuerpos, la propiedad se compara utilizando la misma forma del anticuerpo. Por ejemplo, si se afirma que un anticuerpo tiene menos actividad en comparación con la actividad de la forma correspondiente de un primer anticuerpo, eso significa que una forma particular, tal como un Fab de ese anticuerpo, tiene menos actividad en comparación con la forma Fab del primer anticuerpo.

Como se emplea en la presente memoria, un anticuerpo completo es un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas completas (p. ej., $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ o $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}CO_{H4}$) y dos cadenas ligeras completas (V_L-C_L) y regiones bisagra, tales como los anticuerpos humanos producidos por las células B que secretan anticuerpos y anticuerpos con los mismos dominios que se producen sintéticamente.

Como se emplea en la presente memoria, el fragmento de anticuerpo o la porción de anticuerpo se refiere a cualquier porción de un anticuerpo completo que sea menor que la longitud completa pero que contenga al menos una porción de la región variable del anticuerpo suficiente para formar un sitio de unión a antígeno (p. ej., una o más CDR) y, por lo tanto, conserve la especificidad de unión y/o una actividad del anticuerpo completo; los fragmentos de anticuerpos incluyen derivados de anticuerpos producidos por el tratamiento enzimático de anticuerpos completos, así como sintéticamente, p. ej., derivados producidos de forma recombinante. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', $F(ab)_2$, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y fragmentos de Fd (véase, por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 207: *Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols* (2003); Capítulo 1; págs. 3-25, Kipriyanov). El fragmento puede incluir múltiples cadenas unidas entre sí, por ejemplo mediante puentes disulfuro y/o mediante conectores peptídicos. Un fragmento de anticuerpo generalmente contiene al menos aproximadamente 50 aminoácidos y típicamente al menos 200 aminoácidos.

Como se emplea en la presente memoria, un fragmento de anticuerpo Fv se compone de un dominio pesado variable (V_H) y un dominio ligero variable (V_L) unidos por interacciones no covalentes.

Como se emplea en la presente memoria, un dsFv se refiere a un Fv con un enlace disulfuro intermolecular diseñado, que estabiliza el par V_H-V_L .

Como se emplea en la presente memoria, un fragmento Fd es un fragmento de un anticuerpo que contiene un dominio variable (V_H) y un dominio de región constante (C_{H1}) de una cadena pesada de anticuerpo.

Como se emplea en la presente memoria, un fragmento Fab es un fragmento de anticuerpo que resulta de la digestión de una inmunoglobulina completa con papaína, o un fragmento que tiene la misma estructura que se produce sintéticamente, p. ej., por métodos recombinantes. Un fragmento Fab contiene una cadena ligera (que contiene una V_L y C_L) y otra cadena que contiene un dominio variable de una cadena pesada (V_H) y un dominio de región constante de la cadena pesada (C_{H1}).

Como se emplea en la presente memoria, un fragmento $F(ab')_2$ es un fragmento de anticuerpo que resulta de la digestión de una inmunoglobulina con pepsina a pH 4,0-4,5, o un fragmento que tiene la misma estructura que se produce sintéticamente, p. ej., por métodos recombinantes. El fragmento $F(ab')_2$ contiene esencialmente dos fragmentos Fab donde cada porción de cadena pesada contiene unos pocos aminoácidos adicionales, incluidos los residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro que unen los dos fragmentos.

Como se emplea en la presente memoria, un fragmento Fab' es un fragmento que contiene una mitad (una cadena pesada y una cadena ligera) del fragmento $F(ab')_2$.

Como se emplea en la presente memoria, un fragmento Fd' es un fragmento de un anticuerpo que contiene una porción de cadena pesada de un fragmento $F(ab')_2$.

Como se emplea en la presente memoria, un fragmento Fv' es un fragmento que contiene solamente los dominios V_H y V_L de una molécula de anticuerpo.

Como se emplea en la presente memoria, hsFv se refiere a fragmentos de anticuerpos en los cuales los dominios constantes normalmente presentes en un fragmento Fab han sido sustituidos por un dominio de bobina en espiral heterodimérico (véase, p. ej., Arndt et al. (2001) *J Mol Biol.* 7: 312: 221-228).

Como se emplea en la presente memoria, un fragmento scFv se refiere a un fragmento de anticuerpo que contiene una cadena ligera variable (V_L) y una cadena pesada variable (V_H), covalentemente conectadas por un conector polipeptídico en cualquier orden. El conector tiene una longitud tal que los dos dominios variables se unen mediante puentes sin una interferencia sustancial. Los conectores ilustrativos son residuos de $(Gly-Ser)_n$ con algunos residuos de Glu o Lys dispersados para aumentar la solubilidad.

Como se emplea en la presente memoria, los diacuerpos son scFv diméricos; los diacuerpos típicamente tienen

conectores peptídicos más cortos que los scFv, y preferentemente forman dímeros.

Como se emplea en la presente memoria, un "dominio" polipeptídico es una parte de un polipéptido (una secuencia de tres o más, generalmente 5, 10 o más aminoácidos) que es estructural o funcionalmente distinguible o definible.

Un dominio polipeptídico ilustrativo es una parte del polipéptido que puede formar una estructura plegada independientemente dentro de un polipéptido formado por uno o más motivos estructurales (p. ej., combinaciones de hélices alfa y/o cadenas beta conectadas por regiones de bucle) y/o que es reconocida por una actividad funcional concreta, tal como la actividad enzimática, la dimerización o la unión a antígeno. Un polipéptido puede tener uno o más dominios distintos, típicamente más de uno. Por ejemplo, el polipéptido puede tener uno o más dominios estructurales y uno o más dominios funcionales. Un único dominio polipeptídico se puede distinguir basándose en la estructura y la función. Un dominio puede abarcar una secuencia lineal contigua de aminoácidos. Alternativamente, un dominio puede abarcar una pluralidad de porciones de aminoácidos no contiguas, que no son contiguas a lo largo de la secuencia lineal de aminoácidos del polipéptido. Típicamente, un polipéptido contiene una pluralidad de dominios. Por ejemplo, cada cadena pesada y cada cadena ligera de una molécula de anticuerpo contiene una pluralidad de dominios de inmunoglobulina (Ig), cada uno de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud. Los expertos en la técnica están familiarizados con los dominios polipeptídicos y pueden identificarlos en virtud de la homología estructural y/o funcional con otros dominios similares. Para la ilustración en la presente memoria, se proporcionan definiciones, pero se entiende que está dentro de la técnica reconocer los dominios particulares por su nombre. Si es necesario, se puede emplear el soporte lógico adecuado para identificar los dominios. Como se emplea en la presente memoria, un dominio variable con referencia a un anticuerpo es un dominio de Ig específico de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos que varía entre diferentes anticuerpos. Cada cadena ligera y cada cadena pesada tienen un dominio de región variable (V_L y V_H). Los dominios variables proporcionan especificidad de antígeno y, por lo tanto, son responsables del reconocimiento del antígeno. Cada región variable contiene CDR que forman parte del dominio del sitio de unión al antígeno y regiones marco (FR).

Como se emplea en la presente memoria, "región hipervariable", "HV", "región determinante de la complementariedad", "CDR" y "CDR de anticuerpo" se utilizan de manera indistinta para hacer referencia a una de una pluralidad de porciones dentro de cada región variable que forman juntas un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Cada dominio de región variable contiene tres CDR, denominadas CDR1, CDR2 y CDR3. Las tres CDR no son contiguas a lo largo de la secuencia de aminoácidos lineal, pero están próximas en el polipéptido plegado. Las CDR se encuentran dentro de los bucles que unen las hebras paralelas de las láminas beta del dominio variable.

Como se emplea en la presente memoria, "dominio de unión a antígeno", "sitio de unión a antígeno", "sitio de combinación con el antígeno" y "sitio de combinación con el anticuerpo" se utilizan de forma indistinta para hacer referencia a un dominio dentro de un anticuerpo que reconoce e interactúa físicamente con el antígeno relacionado. Una molécula de anticuerpo completo convencional nativa tiene dos sitios de unión a antígeno convencionales, cada uno de los cuales contiene porciones de una región variable de cadena pesada y porciones de una región variable de cadena ligera. Un sitio de unión a antígeno convencional contiene los bucles que conectan las hebras beta anti-paralelas dentro de los dominios de región variable. Los sitios de combinación con antígenos pueden contener otras porciones de los dominios de región variable. Cada sitio de unión a antígeno convencional contiene tres regiones hipervariables de la cadena pesada y tres regiones hipervariables de la cadena ligera. Las regiones hipervariables también se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR).

Como se emplea en la presente memoria, "porción del mismo" en referencia a una cadena pesada o ligera de anticuerpo o una cadena pesada o ligera variable se refiere a una porción contigua del mismo que es suficiente para formar un sitio de unión al antígeno tal que, cuando se ensambla en un anticuerpo que contiene una cadena pesada y ligera, contiene al menos 1 o 2, típicamente 3, 4, 5 o las 6 CDR de las cadenas pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) suficientes para conservar al menos una porción de la especificidad de unión del correspondiente anticuerpo completo que contiene las 6 CDR. En general, un sitio de unión a antígeno suficiente requiere la CDR3 de la cadena pesada (CDR_{H3}). Por lo general, requiere adicionalmente la CDR3 de la cadena ligera (CDR_{L3}). Como se describe en la presente memoria, un experto en la técnica sabe y puede identificar las CDR basándose en la numeración de Kabat o Chothia (véase p. ej., Kabat, E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Publicación de NIH Núm. 91-3242 y Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917).

Como se emplea en la presente memoria, las regiones marco (FR) son los dominios dentro de los dominios de la región variable del anticuerpo que están localizados dentro de las láminas beta; las regiones FR están comparativamente más conservadas, en términos de sus secuencias de aminoácidos, que las regiones hipervariables.

Como se emplea en la presente memoria, un dominio de región constante es un dominio en una cadena pesada o ligera de anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos que está comparativamente más conservada entre los anticuerpos que el dominio de la región variable. Cada cadena ligera tiene un solo dominio de la región constante

de cadena ligera (C_L) y cada cadena pesada contiene uno o más dominios de las regiones constantes de cadena pesada (C_H), que incluyen, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} . Los isotipos IgA, IgD e IgG completos contienen C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y una región bisagra, mientras que IgE e IgM contienen C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} . Los dominios C_{H1} y C_L extienden el brazo Fab de la molécula de anticuerpo, contribuyendo así a la interacción con el antígeno y a la rotación de los brazos de anticuerpo. Las regiones constantes de anticuerpos pueden cumplir funciones efectoras, tales como, pero no limitadas a, el aclaramiento de antígenos, patógenos y toxinas a los que se une específicamente el anticuerpo, p. ej., a través de interacciones con diversas células, biomoléculas y tejidos.

Como se emplea en la presente memoria, la frase "derivado de" o "derivado" cuando se refiere a fragmentos de anticuerpos derivados de otro anticuerpo, tales como un anticuerpo monoclonal, se refiere a la modificación genética de fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos Fab, $F(ab')$, $F(ab')_2$, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd') que conservan la especificidad de unión del anticuerpo original o parental. Tales fragmentos se pueden obtener mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, escisión enzimática, entrecruzamiento químico, medios recombinantes o combinaciones de los mismos. En general, el fragmento de anticuerpo obtenido comparte la región variable de la cadena pesada (V_H) idéntica o sustancialmente idéntica y la región variable de la cadena ligera (V_L) del anticuerpo parental, de manera que el fragmento de anticuerpo y el anticuerpo parental se unen al mismo epítipo.

Como se emplea en la presente memoria, un "anticuerpo parental" o "anticuerpo de origen" se refiere a un anticuerpo del cual se obtiene un fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmentos Fab, $F(ab')$, $F(ab')_2$, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd').

Como se emplea en la presente memoria, un anticuerpo de proteína de puntos de control inmunitario, se refiere a cualquier anticuerpo que se une específicamente a una proteína de puntos de control inmunitario o fragmento soluble de la misma y bloquea su actividad o inhibe o reduce su actividad. Un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario generalmente se une a una proteína ligando de puntos de control inmunitario o a una proteína receptora de puntos de control inmunitario y bloquea la unión de un receptor a la proteína ligando de puntos de control inmunitario diana o a un ligando para la proteína receptora de puntos de control inmunitario diana, evitando de ese modo la transducción de la señal inhibidora que suprime una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, los anticuerpos anti-proteínas de puntos de control inmunitario son inhibidores de puntos de control inmunitario. La referencia a anticuerpos de proteínas de puntos de control inmunitario en la presente memoria incluyen anticuerpos completos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a una proteína ligando o receptora de puntos de control inmunitario. Los anticuerpos anti-proteínas de puntos de control inmunitario ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) y anticuerpos anti-proteína 1 de muerte celular programada (PD-1).

Como se emplea en la presente memoria, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario se refiere a un anticuerpo derivado de un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario pero que es menor que la secuencia completa del anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario pero que contiene al menos una porción de las regiones variables (pesada y ligera) del anticuerpo suficiente para formar un sitio de unión a antígeno (p. ej., una o más CDR y, en general, todas las CDR) y, por lo tanto, conserva la especificidad de unión y/o la actividad del anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario.

Como se emplea en la presente memoria, el anticuerpo anti-CTLA4 se refiere a cualquier anticuerpo que se una específicamente a la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) o un fragmento soluble de la misma y bloquea la unión de los ligandos a CTLA4, lo que da como resultado una inhibición competitiva de CTLA4 y una inhibición de la inhibición mediada por CTLA4 de la activación de células T. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CTLA4 son inhibidores de CTLA4. La referencia a anticuerpos anti-CTLA4 en la presente memoria incluye un anticuerpo completo y derivados del mismo, tales como fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a CTLA4. Los anticuerpos anti-CTLA4 ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, Ipilimumab o Tremelimumab, o un derivado o fragmento de unión a antígeno de los mismos.

Como se emplea en la presente memoria, una proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4; también conocida como CD152) se refiere a un receptor inhibidor de la superfamilia de inmunoglobulinas, que está unido por ligandos tales como CD80 (también denominado B7-1) y CD86 (también denominado B7-2). CTLA4 incluye proteínas humanas y no humanas. En particular, el antígeno CTLA4 incluye CTLA4 humano, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10 (véase p. ej., Número de Acceso de GenBank AAL07473.1).

Como se emplea en la presente memoria, el anticuerpo anti-PD-1 se refiere a cualquier anticuerpo que se une específicamente a la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) o a un fragmento soluble de la misma y bloquea la unión de los ligandos a PD-1, lo que da como resultado una inhibición competitiva de PD-1 y una inhibición de la inhibición mediada por PD-1 de la activación de células T. Por lo tanto, los anticuerpos anti-PD-1 son inhibidores de PD-1. La referencia a anticuerpos anti-PD-1 en la presente memoria incluye un anticuerpo completo y

derivados del mismo, tales como fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a PD-1. Los anticuerpos anti-PD-1 ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, Nivolumab, MK-3475, Pidilizumab, o un derivado o fragmento de unión a antígeno de los mismos.

Como se emplea en la presente memoria, un antígeno de proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) se refiere a un receptor inhibidor, que es una proteína de membrana de tipo 1 y está unida por ligandos tales como PD-L1 y PD-L2, que son miembros de familia B7. PD-1 incluye proteínas humanas y no humanas. En particular, el antígeno PD-1 incluye PD-1 humano, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 299 (véase p. ej., Número de Acceso UniProt Q15116.3).

Como se emplea en la presente memoria, el anticuerpo anti-PD-L1 se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al ligando 1 de muerte programada (PD-L1) o un fragmento soluble del mismo y bloquea la unión del ligando a PD-1, lo que da como resultado una inhibición competitiva de PD-1 y una inhibición de la inhibición mediada por PD-1 de la actividad de las células T. Por lo tanto, los anticuerpos anti-PD-L1 son inhibidores de PD-1. La referencia a los anticuerpos anti-PD-L1 en la presente memoria incluye un anticuerpo completo y derivados del mismo, tales como sus fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a PD-L1. Los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 o un derivado o fragmento de unión a antígeno de los mismos.

Como se emplea en la presente memoria, "unir", "unido" o sus variaciones gramaticales se refieren a la participación de una molécula en cualquier interacción atrayente con otra molécula, lo que da como resultado una asociación estable en la que las dos moléculas están muy cerca una de otra. La unión incluye, pero no se limita a, enlaces no covalentes, enlaces covalentes (tales como los enlaces covalentes reversibles e irreversibles), e incluye interacciones entre moléculas tales como, pero no limitadas a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y pequeñas moléculas, tales como compuestos químicos incluyendo fármacos.

Los enlaces ilustrativos son interacciones anticuerpo-antígeno e interacciones receptor-ligando. Cuando un anticuerpo "se une" a un antígeno particular, se refiere al reconocimiento específico del antígeno por el anticuerpo, a través de la interacción anticuerpo-antígeno cognado, en los sitios de combinación de anticuerpos. La unión también puede incluir la asociación de múltiples cadenas de un polipéptido, tales como cadenas de anticuerpos que interaccionan a través de enlaces disulfuro.

Como se emplea en la presente memoria, la actividad de unión se refiere a las características de una molécula, p. ej., un polipéptido, relacionado con si se une o no, y con cómo se une a uno o más compañeros de unión. Las actividades de unión incluyen la capacidad de unirse al compañero o los compañeros de unión, la afinidad con la que se une al compañero de unión (p. ej., alta afinidad), la avidez con la que se une al compañero de unión, la fuerza del enlace con el compañero de unión y/o la especificidad por la unión con el compañero de unión.

Como se emplea en la presente memoria, "afinidad" o "afinidad de unión" describe la fuerza de la interacción entre dos o más moléculas, tales como compañeros de unión, típicamente la fuerza de las interacciones no covalentes entre dos compañeros de unión. La afinidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo por un epítipo antigénico es la medida de la fuerza de las interacciones no covalentes totales entre un sitio de combinación de anticuerpo único y el epítipo. La interacción anticuerpo-antígeno de baja afinidad es débil, y las moléculas tienden a disociarse rápidamente, mientras que la unión del antígeno-anticuerpo de alta afinidad es fuerte y las moléculas permanecen unidas por un período de tiempo más largo. Los métodos para calcular la afinidad son bien conocidos, tales como los métodos para determinar las constantes de asociación/disociación. Por ejemplo, una elevada afinidad de anticuerpos significa que el anticuerpo se une específicamente a una proteína diana con una constante de asociación en equilibrio (K_A) de más de o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1} , de más de o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} , de más de o igual a aproximadamente 10^8 M^{-1} , o de más de o igual a aproximadamente 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} o 10^{12} M^{-1} . Los anticuerpos también se pueden caracterizar por una constante de disociación en equilibrio (K_D) 10^{-4} M , de 10^{-6} M a 10^{-7} M , o 10^{-8} M , 10^{-10} M , 10^{-11} M o 10^{-12} M o inferior. La afinidad se puede estimar empíricamente o las afinidades se pueden determinar comparativamente, p. ej., comparando la afinidad de un anticuerpo y otro anticuerpo para un antígeno particular. Por ejemplo, tales afinidades se pueden determinar fácilmente utilizando técnicas convencionales, tales como diálisis en equilibrio; utilizando el aparato BIAcore 2000, utilizando procedimientos generales descritos por el fabricante; por radioinmunoensayo utilizando antígeno diana radiomarcado; o por otro método conocido por el experto en la técnica. Los datos de afinidad se pueden analizar, por ejemplo, por el método de Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51: 660 (1949).

Como se emplea en la presente memoria, la avidez del anticuerpo se refiere a la fuerza de las interacciones múltiples entre un anticuerpo multivalente y su antígeno cognado, tal como con anticuerpos que contienen múltiples sitios de unión asociados con un antígeno con epítopos repetitivos o una matriz de epítopos. Un anticuerpo de alta avidez tiene una mayor fuerza de tales interacciones en comparación con un anticuerpo de baja avidez.

Como se emplea en la presente memoria, "constante de afinidad" se refiere a una constante de asociación (K_A) utilizada para medir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno. Cuanto mayor sea la constante de afinidad, mayor

será la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Las constantes de afinidad se expresan en unidades de molaridad recíproca (es decir, M^{-1}) y se pueden calcular a partir de la constante de velocidad para la reacción de asociación-disociación medida por la metodología cinética convencional para reacciones de anticuerpos (p. ej., inmunoensayos, resonancia de plasmón superficial u otros ensayos de interacción cinética conocidos en la técnica). La afinidad de unión de un anticuerpo también se puede expresar como una constante de disociación, o K_d . La constante de disociación es la inversa de la constante de asociación, $K_d = 1/K_a$. Por lo tanto, una constante de afinidad también puede ser representada por la K_d .

Como se emplea en la presente memoria, el término "el mismo", cuando se utiliza en referencia a la afinidad de unión al anticuerpo, significa que la constante de asociación (K_a) o la constante de disociación (K_d) están dentro de aproximadamente 1 a 100 veces o 1 a 10 veces la del anticuerpo de referencia (1-100 veces mayor afinidad o 1-100 veces menor afinidad, o cualquier valor numérico o intervalo o valor dentro de tales intervalos, que la del anticuerpo de referencia).

Como se emplea en la presente memoria, "sustancialmente lo mismo" cuando se utiliza en referencia a la constante de asociación (K_a) o constante de disociación (K_d), significa que la constante de asociación está dentro de aproximadamente 5 a 5.000 veces mayor o menor que la constante de asociación, K_a , del anticuerpo de referencia (5-5.000 veces mayor o 5-5.000 veces menor que la el anticuerpo de referencia).

Como se emplea en la presente memoria, "unión específica" o "unión inmuno-específica" con respecto a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se utilizan de manera indistinta en la presente memoria y se refieren a la capacidad del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para formar uno o más enlaces no covalentes con un antígeno cognado, por interacciones no covalentes entre los sitios de combinación de anticuerpos del anticuerpo y el antígeno. Típicamente, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente (o que se une específicamente) es uno que se une a una diana con una constante de afinidad K_a de aproximadamente $1 \times 10^7 M^{-1}$ o $1 \times 10^8 M^{-1}$ o mayor (o una constante de disociación (K_d) de $1 \times 10^{-7} M$ o $1 \times 10^{-8} M$ o menos). Las constantes de afinidad se pueden determinar mediante una metodología cinética convencional para reacciones de anticuerpos, por ejemplo, inmunoensayos, resonancia de plasmón superficial (SPR) (Rich y Myszka (2000) Curr. Opin. Biotechnol 11:54; Englebienne (1998) Analyst. 123:1599), calorimetría de titulación isotérmica (ITC) u otros ensayos de interacción cinética conocidos en la técnica (véanse, p. ej., Paul, ed., Fundamental Immunology, 2ª ed., Raven Press, Nueva York, páginas 332-336 (1989); véase también la Patente de Estados Unidos Núm. 7.229.619 para una descripción de los métodos de SPR e ITC ilustrativos para calcular la afinidad de unión de los anticuerpos). El instrumental y los métodos para la detección y seguimiento en tiempo real de las tasas de unión son conocidos y están disponibles comercialmente (p. ej., BIAcore 2000, BIAcore AB, Upsala, Suecia y GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (1999) Biochem. Soc. Trans. 27:335). Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno particular (p. ej., EGFR) se pueden identificar, por ejemplo, mediante inmunoensayos, tales como radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), resonancia de plasmón superficial u otros mecanismos conocidos por los expertos en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, una respuesta inmunitaria es una respuesta generada por un sujeto animal cuando los linfocitos identifican una molécula antigénica como foránea e inducen la formación de anticuerpos y linfocitos capaces de reaccionar con el antígeno foráneo y actuar para eliminar el antígeno. En particular, la molécula antigénica es un antígeno asociado con una célula tumoral y la respuesta inmunitaria se dirige contra la célula tumoral.

Como se emplea en la presente memoria, una respuesta inmunitaria potenciada es un aumento en la actividad asociada con una respuesta inmunitaria. La actividad inmunitaria potenciada o aumentada se puede medir mediante una variedad de métodos, que incluyen, pero no se limitan a, un aumento de las células inmunitarias circulantes (p. ej., linfocitos) y un aumento de los linfocitos que reconocen específicamente los antígenos tumorales.

Como se emplea en la presente memoria, una respuesta inmunitaria antitumoral es una respuesta inmunitaria específicamente dirigida contra una célula tumoral o un antígeno tumoral.

Como se emplea en la presente memoria, un agente anti-hialuronano se refiere a cualquier agente que modula la síntesis o degradación de hialuronano (HA), alterando de ese modo los niveles de hialuronano en un tejido o célula. Para los fines de la presente memoria, los agentes anti-hialuronano reducen los niveles de hialuronano en un tejido o célula en comparación con la ausencia del agente. Tales agentes incluyen compuestos que modulan la expresión del material genético que codifica la HA sintasa (HAS) y otras enzimas o receptores involucrados en el metabolismo del hialuronano, o que modulan las proteínas que sintetizan o degradan el hialuronano, incluida la función o actividad de HAS. Los agentes incluyen moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas u otros compuestos. Por ejemplo, los agentes anti-hialuronano incluyen, pero no se limitan a, moléculas antisentido o efectoras, anticuerpos, enzimas, inhibidores de moléculas pequeñas y análogos de sustrato de HAS.

Como se emplea en la presente memoria, una enzima de degradación de hialuronano se refiere a una enzima que

cataliza la escisión de un polímero de hialuronano (también denominado ácido hialurónico o HA) en fragmentos de menor peso molecular. Las enzimas de degradación de hialuronano ilustrativas son hialuronidasas, y condroitinasas y liasas particulares que tienen la capacidad de despolimerizar el hialuronano. Las condroitinasas ilustrativas que son enzimas que degradan el hialuronano incluyen, pero no se limitan a, condroitina ABC liasa (también conocida como condroitinasa ABC), condroitina AC liasa (también conocida como condroitina sulfato liasa o condroitina sulfato eliminasa) y condroitina C liasa. La condroitina ABC liasa incluye dos enzimas, la condroitina-sulfato-ABC endoliasa (EC 4.2.2.20) y la condroitina-sulfato-ABC exoliasa (EC 4.2.2.21). Las condroitina-sulfato-ABC endoliasas y las condroitina-sulfato-ABC exoliasas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, las de *Proteus vulgaris* y *Flavobacterium heparinum* (la condroitina-sulfato-ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se expone en SEQ ID NO: 253; Sato et al. (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 (1): 39-46). Las enzimas de condroitinasa AC ilustrativas de bacterias incluyen, pero no se limitan a, aquellas de *Flavobacterium heparinum*, expuesta en SEQ ID NO: 254, de *Vitellivallis vadensis*, expuesta en SEQ ID NO: 255, y de *Arthrobacter aureus* (Tkalec et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1):29-35; Ernst et al. (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5): 387-444). Las enzimas condroitinasa C ilustrativas de bacterias incluyen, pero no se limitan a, aquellas de *Streptococcus* y *Flavobacterium* (Hibi et al. (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48 (2): 121-4; Michelacci et al. (1976) J. Biol. Chem. 251: 1154-8; Tsuda et al. (1999) Eur. J. Biochem. 262: 127-133).

Como se emplea en la presente memoria, hialuronidasa se refiere a una clase de enzimas que degradan el hialuronano. Las hialuronidasas incluyen hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1 o EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36) y hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas incluyen cualquiera de origen no humano incluyendo, pero no limitado a, origen murino, canino, felino, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, de peces, de ranas, bacteriano y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas no humanas ilustrativas incluyen, hialuronidasas de vacas (SEQ ID NO: 176-178 y BH55 (Patentes de Estados Unidos Núm. 5.747.027 y 5.827.721)), avispa chaqueta amarilla (SEQ ID NO: 171 y 172), abeja (SEQ ID NO: 173), avispa cara blanca (SEQ ID NO: 174), avispa de papel (SEQ ID NO: 175), ratón (SEQ ID NO: 193-196), cerdo (SEQ ID NO: 191, 192), rata (SEQ ID NO: 198-201), conejo (SEQ ID NO: 203), oveja (SEQ ID NO: 184-187), chimpancé (SEQ ID NO: 204), mono Rhesus (SEQ ID NO: 202), orangután (SEQ ID NO: 205), mono cinomolgo (SEQ ID NO: 206), cobaya (SEQ ID NO: 197), *Arthrobacter* sp. (cepa FB24) (SEQ ID NO: 222), *Bdellovibrio bacteriovorus* (SEQ ID NO: 223), *Propionibacterium acnes* (SEQ ID NO: 224), *Streptococcus agalactiae* ((SEQ ID NO: 225); 18RS21 (SEQ ID NO: 226); serotipo Ia (SEQ ID NO: 227); y serotipo III (SEQ ID NO: 228)), *Staphylococcus aureus* (cepa COL (SEQ ID NO: 229); cepa MRSA252 (SEQ ID NO: 230, 231); cepa MSSA476 (SEQ ID NO: 232); cepa NCTC 8325 (SEQ ID NO: 233); cepa bovina RF122 (SEQ ID NOS: 234, 235) y cepa USA300 (SEQ ID NO: 236)), *Streptococcus pneumoniae* ((SEQ ID NO: 237); cepa ATCC BAA-255/R6 (SEQ ID NO: 238) y serotipo 2, cepa D39/NCTC 7466 (SEQ ID NO: 239)), *Streptococcus pyogenes* (serotipo M1 (SEQ ID NO: 240); serotipo M2, cepa MGAS10270 (SEQ ID NO: 241); serotipo M4, cepa MGAS10750 (SEQ ID NO: 242); serotipo M6 (SEQ ID NO: 243); serotipo M12, cepa MGAS2096 (SEQ ID NO: 244, 245); serotipo M12, cepa MGAS9429 (SEQ ID NO: 246) y serotipo M28 (SEQ ID NO: 247)); *Streptococcus suis* (SEQ ID NO: 248-250); *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601/ES114 (SEQ ID NO: 251)), y la enzima hialuronidasa de *Streptomyces hyaluronolyticus*, que es específica para el ácido hialurónico y no escinde la condroitina ni el sulfato de condroitina (Ohya, T. y Kaneko, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198:607). Las hialuronidasas también incluyen aquellas de origen humano. Las hialuronidasas humanas ilustrativas incluyen HYAL1 (SEQ ID NO: 218), HYAL2 (SEQ ID NO: 219), HYAL3 (SEQ ID NO: 220), HYAL4 (SEQ ID NO: 221) y PH20 (SEQ ID NO: 217). También se incluyen entre las hialuronidasas las hialuronidasas solubles, que incluyen la PH20 ovina y bovina, la PH20 humana soluble y la rHuPH20 soluble. Los ejemplos de hialuronidasas solubles bovinas u ovinas disponibles comercialmente incluyen Vitrase® (hialuronidasa ovina), Amphadase® (hialuronidasa bovina) e Hydase™ (hialuronidasa bovina).

Como se emplea en la presente memoria, "hialuronidasa testicular bovina purificada" se refiere a una hialuronidasa bovina purificada a partir de extractos testiculares bovinos (véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 2.488.564, 2.488.565, 2.806.815, 2.808.362, 2.676.139, 2.795.529, 5.747.027 y 5.827.721). Los ejemplos de hialuronidasas testiculares bovinas purificadas disponibles comercialmente incluyen Amphadase® e Hydase™, y hialuronidasas bovinas, incluyendo, pero no limitadas a, aquellas disponibles de Sigma Aldrich, Abnova, EMD Chemicals, GenWay Biotech, Inc., Raybiotech, Inc. y Calzyme. También se incluyen hialuronidasas bovinas producidas de forma recombinante, tales como, pero no limitadas a, las generadas por la expresión de una molécula de ácido nucleico expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 181-183.

Como se emplea en la presente memoria, "hialuronidasa testicular ovina purificada" se refiere a una hialuronidasa ovina purificada a partir de extractos testiculares ovinos (véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 2.488.564, 2.488.565 y 2.806.815 y la publicación internacional PCT Núm. WO2005/118799). Los ejemplos de extracto testicular ovino purificado disponible comercialmente incluyen Vitrase® y hialuronidasas ovinas, incluyendo, pero no limitadas a, las disponibles de Sigma Aldrich, Cell Sciences, EMD Chemicals, GenWay Biotech, Inc., Mybiosource.com y Raybiotech, Inc. También se incluyen hialuronidasas ovinas producidas de forma recombinante, tales como, pero no limitadas a, las generadas por la expresión de una molécula de ácido nucleico expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 188-190.

Como se emplea en la presente memoria, "PH20" se refiere a un tipo de hialuronidasa que se produce en el

esperma y es neutro-activo. La PH-20 se produce en la superficie del esperma y en el acrosoma derivado de lisosomas, donde se une a la membrana acrosómica interna. La PH20 incluye aquellas de cualquier origen incluyendo, pero no limitado a, humano, de chimpancé, de monos *Cynomolgus*, de monos Rhesus, murino, bovino, ovino, de cobaya, de conejo y de rata. Los polipéptidos de PH20 ilustrativos incluyen los de ser humano (SEQ ID NO: 217), chimpancé (SEQ ID NO: 204), mono Rhesus (SEQ ID NO: 202), mono *Cynomolgus* (SEQ ID NO: 206), vaca (p. ej., SEQ ID NO: 177, 178), ratón (SEQ ID NO: 196), rata (SEQ ID NO: 201), conejo (SEQ ID NO: 203), oveja (SEQ ID NO: 185-187) y cobaya (SEQ ID NO: 197).

La referencia a enzimas de degradación de hialuronano incluye los polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano precursores y los polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano maduros (tales como aquellos en los que se ha eliminado una secuencia señal), sus formas truncadas que tienen actividad e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con los polipéptidos precursores expuestos en SEQ ID NO: 217 y 129, 130, 171-178, 184-187, 191-206 218-255, 258, 268-272, 274, 300, y 301, o sus formas maduras. Por ejemplo, la referencia a la enzima de degradación de hialuronano también incluye las variantes del polipéptido precursor de PH20 humano expuestas en SEQ ID NO: 179, 180. Las enzimas de degradación de hialuronano también incluyen aquellas 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. Una hialuronidasa PH20 truncada es cualquier forma acortada C-terminal de la misma, en particular las formas que se truncan y se activan de forma neutra cuando están N-glicosiladas.

Como se emplea en la presente memoria, una "PH20 soluble" se refiere a cualquier forma de PH20 que sea soluble en condiciones fisiológicas. Una PH20 soluble se puede identificar, por ejemplo, mediante su reparto en la fase acuosa de una solución de Triton® X-114 a 37°C (Bordier et al., (1981) J. Biol. Chem., 256: 1604-7). La PH20 anclada a membrana, tal como la PH20 anclada en lípidos, incluyendo la PH20 anclada a GPI, se repartirá en la fase rica en detergente, pero se repartirá en la fase acuosa o pobre en detergente después del tratamiento con Fosfolipasa-C. Entre las PH20 solubles se incluyen las PH20 ancladas a la membrana en las que una o más regiones asociadas con el anclaje de la PH20 a la membrana se ha eliminado o modificado, donde la forma soluble conserva la actividad de la hialuronidasa. La PH20 soluble también incluye la PH20 soluble recombinante y aquellas contenidas en o purificadas de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, extractos de testículos de ovejas o vacas. Un ejemplo de tal PH20 soluble es la PH20 humana soluble.

Como se emplea en la presente memoria, la PH20 humano soluble o sHuPH20 incluye polipéptidos de PH20 que carecen de la totalidad o de una parte de la secuencia de anclaje del glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C de manera que, tras la expresión, los polipéptidos son solubles en condiciones fisiológicas. La solubilidad se puede evaluar mediante cualquier método adecuado que demuestre solubilidad en condiciones fisiológicas. Un ejemplo de tales métodos es el ensayo de Triton® X-114, que evalúa el reparto en la fase acuosa y que se ha descrito anteriormente y en los ejemplos. Además, un polipéptido de PH20 humano soluble, si se produce en células CHO, tales como las células CHO-S, es un polipéptido que se expresa y se secreta en el medio de cultivo celular. Los polipéptidos de PH20 humanos solubles, sin embargo, no se limitan a los producidos en células CHO, sino que se pueden producir en cualquier célula o por cualquier método, incluyendo la expresión recombinante y la síntesis de polipéptidos. La referencia a la secreción por células CHO es definitoria. Por lo tanto, si un polipéptido podría ser expresado y secretado por las 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, se produzca o no de esta manera. Los polipéptidos precursores para los polipéptidos sHuPH20 pueden incluir una secuencia señal, tal como una secuencia señal heteróloga o no heteróloga (es decir, nativa). Los precursores ilustrativos son aquellos que incluyen una secuencia de señal, tal como la secuencia señal de 35 aminoácidos nativa en las posiciones de aminoácidos 1-35 (véanse, p. ej., aminoácidos 1-35 de SEQ ID NO: 217). Los polipéptidos de PH20 humanos solubles ilustrativos incluyen un polipéptido de PH20 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158 y conserva la actividad hialuronidasa.

Como se emplea en la presente memoria, "PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20)" se refiere a una composición que contiene formas solubles de PH20 humana expresada de forma recombinante y secretada en células de ovario de hámster chino (CHO). La rHuPH20 soluble está codificada por una molécula de ácido nucleico que incluye la secuencia señal y se expone en SEQ ID NO: 111. El ácido nucleico que codifica la rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. Tal como se produce en el medio de cultivo, hay heterogeneidad en el extremo C de modo que el producto incluye una mezcla de especies que puede incluir uno o más de SEQ ID NO: 123-128 en diferente abundancia.

Como se emplea en la presente memoria, un "producto conjugado" se refiere a un polipéptido unido directa o

indirectamente a uno o más de otros polipéptidos o radicales químicos. Tales productos conjugados incluyen proteínas de fusión, aquellas producidas por productos conjugados químicos y aquellas producidas por cualquier otro método. Por ejemplo, un producto conjugado se refiere a una enzima de degradación de hialuronano, tal como un hialuronidasa o polipéptido de PH20 soluble, unido directa o indirectamente a uno o más polipéptidos o radicales químicos diferentes, por lo que al menos un polipéptido de PH20 soluble está conectado, directa o indirectamente, a otro polipéptido o radical químico siempre que el producto conjugado conserve la actividad hialuronidasa.

Como se emplea en la presente memoria, una "enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero" se refiere a una enzima de degradación de hialuronano que está ligada directa o indirectamente a un polímero. La conexión puede ser cualquier tipo de conexión, incluyendo, pero no limitada a, enlaces iónicos y covalentes, y cualquier otra interacción asociada suficientemente estable. Por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, incluye una hialuronidasa o un polipéptido de PH20 soluble conjugado con un polímero. La referencia a una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero significa que el producto conjugado muestra actividad hialuronidasa. Típicamente, el producto conjugado con polímero muestra al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de la actividad hialuronidasa en comparación con la enzima de degradación de hialuronano que no está conjugada con un polímero.

Como se emplea en la presente memoria, un "radical unido a N" se refiere a un residuo de aminoácido asparragina (N) de un polipéptido que es susceptible de ser glicosilado por modificación postraducciona de un polipéptido. Los radicales ligados a N ilustrativos de PH20 humana incluyen los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humano expuestos en SEQ ID NO: 217.

Como se emplea en la presente memoria, un "polímero" se refiere a cualquier radical natural o sintético de alto peso molecular que se compone de unidades repetitivas. Los polímeros incluyen, pero no se limitan a, radicales de polietilenglicol, dextrano, celulosa y ácido siálico. Estos y otros polímeros ilustrativos se describen en la presente memoria, y muchos son conocidos en la técnica. Para los fines de la presente memoria, el polímero puede estar conjugado con, es decir, ligado de manera estable directa o indirectamente a través de un conector, a un polipéptido. Tales productos conjugados poliméricos, típicamente aumentan la semi-vida en suero, e incluyen, pero no se limitan a, radicales siálicos, radicales de PEGilación, dextrano y azúcar y otros radicales, tales como glicosilación. Por ejemplo, las hialuronidasas, tales como una PH20 soluble o rHuPH20, se pueden conjugar con un polímero.

Como se emplea en la presente memoria, "PEGilado" se refiere al anclaje covalente u otro anclaje estable de moléculas poliméricas, tales como polietilenglicol (radical de PEGilación PEG) a las proteínas, incluyendo las enzimas de degradación de hialuronano, tales como las hialuronidasas, típicamente para aumentar la semi-vida de la enzima de degradación de hialuronano.

Como se emplea en la presente memoria, un agente anti-canceroso o un agente quimioterapéutico se refiere a un agente que es capaz de destruir las células que se dividen rápidamente, tales como las células cancerosas. Un experto en la técnica está familiarizado con los agentes anti-cancerosos, incluyendo los agentes quimioterapéuticos. Los agentes ilustrativos se describen en la presente memoria.

Como se emplea en la presente memoria, un profármaco es un compuesto que muestra actividad farmacológica después de la biotransformación. Por ejemplo, los análogos de nucleósidos tales como la gemcitabina son profármacos, por lo que su actividad se produce como resultado de la conversión intracelular en dos metabolitos activos, el difosfato de gemcitabina y el trifosfato de gemcitabina por la desoxicitidina quinasa. El trifosfato (trifosfato de difluorodesoxicitidina) compite con los desoxinucleósidos trifosfato endógenos por su incorporación en el ADN.

Como se emplea en la presente memoria, un derivado con referencia a un fármaco se refiere a una forma de un fármaco que ha sufrido cambios o modificaciones con respecto a un fármaco o agente de referencia, pero que aún conserva la actividad (p. ej., muestra un aumento o disminución de actividad) en comparación con el fármaco o agente de referencia. Normalmente, una forma derivada de un compuesto significa que una cadena lateral del compuesto se ha modificado o cambiado.

Como se emplea en la presente memoria, un análogo o análogo de un fármaco o agente es un fármaco o agente que está relacionado con un fármaco de referencia, pero cuyas actividades químicas y biológicas pueden ser diferentes. Típicamente, los análogos muestran actividades similares a un fármaco o agente de referencia, pero la actividad se puede aumentar o disminuir o mejorar de otro modo. Típicamente, una forma análoga de un compuesto o medicamento significa que el núcleo de la cadena principal de la estructura se modifica o cambia en comparación con un fármaco de referencia.

Como se emplea en la presente memoria, "actividad" se refiere a una actividad o actividades funcionales de un polipéptido o porción del mismo asociadas con una proteína con toda su longitud (completa). Por ejemplo, los fragmentos activos de un polipéptido pueden mostrar una actividad de una proteína con toda su longitud. Las actividades funcionales incluyen, pero no se limitan a, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática,

antigenicidad (capacidad para unirse o competir con un polipéptido por la unión a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, capacidad para formar multímeros y capacidad para unirse específicamente a un receptor, ligando o antígeno.

5 Como se emplea en la presente memoria, "actividad hialuronidasa" se refiere a la capacidad para catalizar enzimáticamente la escisión del ácido hialurónico. El ensayo XXII de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) para la hialuronidasa determina la actividad de la hialuronidasa indirectamente midiendo la cantidad de ácido hialurónico de mayor peso molecular o hialuronano (HA) que queda después de dejar que la enzima reaccione con HA durante 30 min a 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, MD). Se puede utilizar una solución patrón en un ensayo para determinar la actividad relativa, en unidades, de cualquier hialuronidasa. Los ensayos *in vitro* para determinar la actividad hialuronidasa de las hialuronidasas, tales como PH20, incluyendo PH20 soluble y esPH20, son conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria. Los ensayos ilustrativos incluyen el ensayo de microturbidez que mide la escisión del ácido hialurónico por hialuronidasa indirectamente detectando el producto precipitado insoluble que se forma cuando el ácido hialurónico no escindido se une con la albúmina sérica y el ensayo de ácido hialurónico biotinilado que mide la escisión del ácido hialurónico indirectamente al detectar el ácido hialurónico biotinilado unido de manera no covalente a los pocillos de la placa de microtitulación con un producto conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante y un sustrato cromogénico. Se pueden utilizar Patrones de referencia, por ejemplo, para generar una curva estándar para determinar la actividad en Unidades de la hialuronidasa que se está sometiendo a prueba.

20 Como se emplea en la presente memoria, la actividad específica se refiere a Unidades de actividad por mg de proteína. Los miligramos de hialuronidasa se definen por la absorción de una solución de 280 nm, suponiendo un coeficiente de extinción molar de aproximadamente 1,7, en unidades de $M^{-1} cm^{-1}$.

25 Como se emplea en la presente memoria, "activo neutro" se refiere a la capacidad de un polipéptido de PH20 para catalizar enzimáticamente la escisión del ácido hialurónico a pH neutro (p. ej., a o aproximadamente a pH 7,0).

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

40 Como se emplea en la presente memoria, "ácidos nucleicos" incluye ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos peptidónucleicos (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser de hebra sencilla o doble. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están marcados opcionalmente, tales como con una marca detectable, tal como una marca fluorescente o radiomarca, se contemplan moléculas de hebra sencilla. Tales moléculas tienen típicamente una longitud tal que su diana es estadísticamente único o de bajo número de copias (típicamente menos de 5, generalmente menos de 3) para sondear o cebar una biblioteca. En general, una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas y los cebadores pueden tener una longitud de 10, 20, 30, 50, 100 o más nucleótidos.

50 Como se emplea en la presente memoria, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene una longitud mayor o igual a 2 aminoácidos, y una longitud menor o igual a 40 aminoácidos.

55 Como se emplea en la presente memoria, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria se identifican de acuerdo con sus abreviaturas conocidas de tres letras o de una letra (Tabla 1). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones convencionales de una sola letra utilizadas habitualmente en la técnica.

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

Como se emplea en la presente memoria, "residuo de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los residuos de aminoácidos descritos en la presente memoria están en la forma isómera "L". Los residuos en la forma isomérica "D", que se designan así, se pueden sustituir por cualquier residuo de L-aminoácido siempre que la propiedad funcional deseada sea conservada por el polipéptido. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos convencional descrita en J. Biol. Chem., 243:3557-3559 (1968), y adoptada 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, las abreviaturas para los residuos de aminoácido se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. Tabla de Correspondencia.		
SÍMBOLO		
1 Letra	3 Letras	AMINOÁCIDOS
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 aminoácidos representadas en la presente memoria mediante fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxilo. Además, la expresión "residuo de aminoácido" se define para incluir los aminoácidos enumerados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y los aminoácidos modificados e inusuales, tales como los mencionados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822. Además, se debe tener en cuenta que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácido, a un grupo amino-terminal tal como NH₂ o a un grupo carboxilo terminal tal como COOH.

Como se emplea en la presente memoria, los "α-aminoácidos de origen natural" son los residuos de esos 20 α-aminoácidos que se encuentran en la naturaleza que se incorporan a la proteína mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm cognado en los seres humanos. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural e incluyen, pero no se limitan a, los estereoisómeros D de los aminoácidos. Los

aminoácidos no naturales ilustrativos se describen en la presente memoria y son conocidos por los expertos en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, una construcción de ADN es una molécula de ADN lineal o circular de hebra sencilla o doble que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera que no se encuentra en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como resultado de la manipulación humana e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

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

Como se emplea en la presente memoria, el término polinucleótido significa un polímero de hebra sencilla o doble de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leído desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizar *in vitro* o preparar a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula polinucleotídica se proporciona en la presente memoria en términos de nucleótidos (abreviado como "nt") o pares de bases (abreviado como "pb"). El término nucleótidos se utiliza para moléculas de hebra sencilla y doble donde el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas de doble hebra, se utiliza para indicar la longitud total y se entenderá que es equivalente al término pares de bases. Los expertos en la técnica reconocerán que las dos hebras de un polinucleótido de doble hebra pueden diferir ligeramente en longitud y que sus extremos pueden ser escalonados; por lo tanto, es posible que no todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido de doble hebra estén emparejados. Tales extremos no pareados, en general, no superarán los 20 nucleótidos de longitud.

Como se emplea en la presente memoria, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud se puede basar en el grado de identidad y/u homología de las secuencias de residuos y en los residuos que contiene. Los expertos en la técnica conocen métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencias, dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se alinean de una manera que produce un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere a la medida en que las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariables. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos y, en cierta medida, las secuencias de nucleótidos, también pueden tener en cuenta las diferencias conservativas y/o las sustituciones frecuentes en los aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son aquellas que preservan las propiedades físico-químicas de los residuos implicados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas en toda la longitud de las secuencias e incluyendo todos los residuos) o locales (el alineamiento de una parte de las secuencias que incluye solo la región o regiones más similares).

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

Como se emplea en la presente memoria, homólogo (con respecto a las secuencias de ácido nucleico y/o aminoácido) significa una homología de secuencia mayor o igual a 25%, típicamente mayor o igual a 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de homología de secuencia; el porcentaje preciso se puede especificar si es necesario. Para los fines de la presente memoria, los términos "homología" e "identidad" a menudo se utilizan de manera indistinta, a menos que se indique lo contrario. En general, para la determinación del porcentaje de homología o identidad, las secuencias se alinean de modo que se obtenga la mayor coincidencia de orden (véase, p.ej.: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por homología de secuencia, el número de aminoácidos conservados se determina mediante programas de algoritmos de alineamiento convencionales, y se puede utilizar con las penalizaciones por hueco predeterminadas establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico substancialmente homólogas se hibridarán típicamente a una rigurosidad moderada o a una alta rigurosidad a lo largo de la longitud del ácido nucleico de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula

de ácido nucleico de hibridación.

Si dos moléculas tienen secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que son al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas" u "homólogas" se puede determinar utilizando algoritmos informáticos conocidos, como el programa "FASTA", utilizando, por ejemplo, los parámetros predeterminados como en Pearson et al. (1988) Proc. Natl Acad Sci. USA 85:2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul, S.F., et al., J Mol Biol 215:403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, editor, Academic Press, San Diego, 1994 y Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por ejemplo, se puede utilizar la función BLAST de la base de datos de información del Centro Nacional de Biotecnología para determinar la identidad. Otros programas disponibles comercial o públicamente incluyen el programa "MegAlign" de DNASTar (Madison, WI) y el programa "Gap" del University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) (Madison WI). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico se puede determinar, por ejemplo, comparando la información de secuencia utilizando un programa de informático GAP (p. ej., Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443, revisado por Smith y Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2: 482). Brevemente, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros predeterminados 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 Gribskov et al. (1986) Nucl. Acidos Res. 14:6745, según lo descrito por Schwartz y Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pág. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 por cada hueco y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada hueco; y (3) no hay penalización para los huecos finales.

Por lo tanto, como se emplea en la presente memoria, el término "identidad" u "homología" representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de prueba y uno de referencia. Como se emplea en la presente memoria, el término al menos "90% idéntico a" se refiere a identidades porcentuales de 90 a 99,99 con respecto a la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de referencia del polipéptido. La identidad a un nivel de 90% o más es indicativa del hecho de que, asumiendo con fines de ilustrativos, se comparan una longitud de polipéptido de prueba y uno de referencia de 100 aminoácidos. No más de 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de prueba difiere del polipéptido de referencia. Se pueden hacer comparaciones similares entre los polinucleótidos de prueba y de referencia. Tales diferencias se pueden representar como mutaciones puntuales distribuidas al azar en toda la longitud de un polipéptido o se pueden agrupar en una o más ubicaciones de longitud variable hasta el máximo permitido. p. ej., una diferencia de aminoácidos de 10/100 (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos. A nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente 85-90%, el resultado debe ser independiente del programa y los parámetros de hueco establecidos; estos altos niveles de identidad se pueden evaluar fácilmente, a menudo mediante alineación manual sin depender del soporte lógico.

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

Como se emplea en la presente memoria, "cebador" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como un punto de inicio de la síntesis de ADN dirigida por un molde en condiciones apropiadas (p. ej., en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y un agente de polimerización, tal como la ADN polimerasa, la ARN polimerasa o la transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Se apreciará que ciertas moléculas de ácido nucleico pueden servir como una "sonda" y como un "cebador". Un cebador, sin embargo, tiene un grupo hidroxilo 3' para su extensión. Se puede utilizar un cebador en una variedad de métodos, que incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcriptasa inversa (RT)-PCR, ARN PCR, LCR, PCR multiplex, PCR angosta, PCR de captura, PCR de expresión, RACE 3' y 5', PCR *in situ*, PCR mediada por ligación y otros protocolos de amplificación.

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

Como se emplea en la presente memoria, "hibrida específicamente" se refiere a la reasociación, mediante el emparejamiento de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (p. ej., un oligonucleótido) a una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la técnica están familiarizados con los parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan la hibridación específica, tales como la longitud y la composición de la molécula en particular. Los

parámetros particularmente relevantes para la hibridación *in vitro* incluyen además la temperatura de reasociación y lavado, la composición del tampón y la concentración de sal. Las condiciones de lavado ilustrativas para eliminar las moléculas de ácido nucleico unidas no específicamente a una alta rigurosidad son 0.1 x SSPE, SDS al 0,1%, 65°C, y a una rigurosidad media son 0,2 x SSPE, SDS al 0,1%, 50°C. Las condiciones de rigurosidad equivalentes son conocidas en la técnica. El experto en la técnica puede ajustar fácilmente estos parámetros para lograr la hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con a una molécula de ácido nucleico diana apropiada para una aplicación particular. Complementario, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridar, típicamente con menos de 25%, 15% o 5% de emparejamientos erróneos entre nucleótidos opuestos. Si es necesario, se especificará el porcentaje de complementariedad. Normalmente, las dos moléculas se seleccionan de modo que hibriden en condiciones de alta rigurosidad.

Como se emplea en la presente memoria, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar, de modo que la propiedad de interés permanezca suficientemente inalterada como para que se pueda utilizar el producto sustancialmente idéntico en lugar del producto.

Como se emplea en la presente memoria, también se entiende que los términos "sustancialmente idénticos" o "similares" varían con el contexto según lo entienden los expertos en la técnica relevante.

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

Como se emplea en la presente memoria, "alelo", que se utiliza de manera indistinta en la presente memoria con "variante alélica", se refiere a formas alternativas de un gen o porciones del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o posición en los cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigoto para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigoto para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un solo nucleótido o en 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.

Como se emplea en la presente memoria, las variantes de especie se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, tales como ratón y ser humano. Por ejemplo, para PH20, las variantes de especie ilustrativas proporcionadas en la presente memoria son PH20 de primate, tales como, pero no limitados a, ser humano, chimpancé, macaco y mono cinomolgo. En general, las variantes de especie tienen 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o más de identidad de secuencia. Los residuos correspondientes entre las variantes de especie se pueden determinar comparando y alineando secuencias para maximizar el número de nucleótidos o residuos coincidentes, por ejemplo, de modo que la identidad entre las secuencias sea igual o superior a 95%, igual o superior a 96%, igual o superior a 97%, igual o superior a 98%, o igual o superior a 99%. A la posición de interés se le proporciona el número asignado en la molécula de ácido nucleico de referencia. El alineamiento se puede efectuar de forma manual o a simple vista, en particular, donde la identidad de secuencia es mayor de 80%.

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

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

Como se emplea en la presente memoria, la modificación se refiere a la modificación de una secuencia de

aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico e incluye delecciones, inserciones y reemplazos (p. ej., sustituciones) de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Las modificaciones ilustrativas son sustituciones de aminoácidos. Un polipéptido sustituido con un aminoácido puede mostrar 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o más de identidad de secuencia con un polipéptido que no contiene las sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas o no conservativas. En general, cualquier modificación de un polipéptido conserva una actividad del polipéptido. Los métodos para modificar un polipéptido son rutinarios para los expertos en la técnica, tales como el uso de metodologías de ADN recombinante.

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

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos conservativas	
Residuo original	Sustitución conservativa ilustrativa
Ala (a)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; Su
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

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

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

Como se emplea en la presente memoria, el polipéptido o proteína aislados o purificados o su porción biológicamente activa están sustancialmente libres de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido del cual se obtiene la proteína, o sustancialmente libres de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Se puede determinar que las preparaciones están sustancialmente libres si parecen libres de impurezas fácilmente detectables según lo determinado por los métodos convencionales de análisis, tales como la cromatografía en capa fina (TLC), la electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), utilizadas por los expertos en la técnica para evaluar dicha pureza, o suficientemente pura para que una purificación adicional no altere de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tales como las

actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la técnica conocen métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros. Sin embargo, un compuesto sustancialmente químicamente puro puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, una purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

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

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

Como se emplea en la presente memoria, sintético, con referencia, por ejemplo, a una molécula de ácido nucleico sintética o un gen sintético o un péptido sintético se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula polipeptídica que se producen por métodos recombinantes y/o por métodos de síntesis química.

Como se emplea en la presente memoria, la producción por medios recombinantes o utilizando métodos de ADN recombinante significa el uso de métodos bien conocidos de la biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.

Como se emplea en la presente memoria, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se utilizan para introducir un ácido nucleico heterólogo en las células para la expresión o la replicación de los mismos. Los vectores típicamente siguen siendo episómicos, pero se pueden diseñar para efectuar la integración de un gen o una porción del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan los vectores que son cromosomas artificiales, tales como los cromosomas artificiales de levadura y los cromosomas artificiales de mamífero. La selección y el uso de tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que está unido operativamente a secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador y una señal de poliadenilación. Los vectores de expresión generalmente derivan de plásmidos o ADN viral, o pueden contener elementos de ambos. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, al introducirse en una célula anfitriona apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen aquellos que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y aquellos que siguen siendo episómicos o aquellos que se integran en el genoma de la célula anfitriona.

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

Como se emplea en la presente memoria, "operablemente" o "ligado operativamente" cuando se refiere a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de modo que funcionen en concierto para sus fines previstos, p. ej., la transcripción se inicia aguas abajo del promotor y aguas arriba de cualquier secuencia transcrita. El promotor suele ser el dominio al que se une la maquinaria transcripcional para iniciar la transcripción y continúa a través del segmento codificante hasta el terminador.

Como se emplea en la presente memoria, se pretende que el término "evaluar" incluya la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteína, tal como una enzima, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también de obtener un índice, proporción, porcentaje, valor visual u otro valor indicativos del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la especie química realmente detectada no necesita, por supuesto, ser el propio producto escindido enzimáticamente, sino que

puede ser, por ejemplo, un derivado del mismo o alguna otra sustancia. Por ejemplo, la detección de un producto de escisión puede ser un radical detectable tal como un radical fluorescente.

5 Como se emplea en la presente memoria, la actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o respuestas fisiológicas que se producen tras la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas se pueden observar en sistemas *in vitro* diseñados para someter a prueba o utilizar tales actividades. Por lo tanto, para los propósitos en la presente memoria, la actividad biológica de una enzima hialuronidasa es su degradación del ácido hialurónico. La actividad biológica de un inhibidor de puntos de control inmunitario puede incluir, pero no se limita a, la unión de una proteína de puntos de control inmunitario, la actividad inhibidora o estimuladora de la proteína de puntos de control inmunitario, la inducción de una respuesta inmunitaria aumentada y/o la inducción de una respuesta inmunitaria específica de un tumor.

15 Como se emplea en la presente memoria equivalente, cuando se hace referencia a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando se utiliza equivalente para referirse a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con solo sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o el péptido. Cuando el equivalente se refiere a una propiedad, no es necesario que la propiedad esté presente en la misma medida (p. ej., dos péptidos pueden mostrar diferentes tasas del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades son generalmente sustancialmente las mismas.

25 Como se emplea en la presente memoria, "modular" y "modulación" o "alterar" se refieren a un cambio de una actividad de una molécula, tal como una proteína. Las actividades ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, actividades biológicas, tales como la transducción de señales. La modulación puede incluir un aumento de la actividad (es decir, regulación por aumento o actividad agonista), una disminución de la actividad (es decir, regulación por disminución o inhibición) o cualquier otra alteración en una actividad (tal como un cambio en la periodicidad, frecuencia, duración, cinética u otro parámetro). La modulación puede depender del contexto y, por lo general, la modulación se compara con un estado designado, por ejemplo, la proteína de tipo salvaje, la proteína en un estado constitutivo o la proteína expresada en un tipo o condición celulares designados.

35 Como se emplea en la presente memoria, la administración directa se refiere a una composición que se administra sin dilución.

Como se emplea en la presente memoria, una formulación de dosis única se refiere a una formulación para uso de una sola vez. Típicamente, una formulación de dosis única es para administración directa.

40 Como se emplea en la presente memoria, una formulación de dosificación múltiple se refiere a una formulación para su uso en administraciones repetidas.

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

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

50 Como se emplea en la presente memoria, "enfermedad o trastorno" se refiere a una condición patológica en un organismo resultante de una causa o afección que incluyen, pero no se limitan a, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas y caracterizadas por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en la presente memoria son enfermedades y trastornos asociados con el hialuronano.

55 Como se emplea en la presente memoria, "administración intravenosa" se refiere al suministro de un agente terapéutico directamente en una vena.

60 Como se emplea en la presente memoria, un "cáncer asociado con hialuronano" o "cánceres ricos en hialuronano" incluye cánceres en los que los niveles de hialuronano se elevan como causa, consecuencia o se observan de otro modo en la enfermedad o afección. Los cánceres o tumores asociados con hialuronano se asocian con niveles elevados de hialuronano en un tejido o célula, aumento de la presión del líquido intersticial, disminución del volumen vascular y/o aumento del contenido de agua en un tejido. Tales cánceres incluyen, por ejemplo, tumores, que incluyen tumores sólidos tales como cánceres de estadio tardío, cánceres metastásicos, cánceres indiferenciados,

cáncer de ovario, carcinoma in situ (CIS), carcinoma de células escamosas (CCE), cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de colon y otros tipos de cáncer.

5 Como se emplea en la presente memoria, hialuronano (HA; también conocido como ácido hialurónico o hialuronato) se refiere a un polímero natural de unidades de disacáridos repetidas de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico. El hialuronano es producido por ciertos tumores.

10 Como se emplea en la presente memoria, los niveles elevados de hialuronano se refieren a cantidades de hialuronano en un tejido, líquido corporal o célula particulares, dependiendo de la enfermedad o afección, consecuencia u observadas de otra manera en la enfermedad. Por ejemplo, como consecuencia de la presencia de un tumor rico en hialuronano, los niveles de hialuronano (HA) se pueden elevar en los fluidos corporales, tales como la sangre, la orina, la saliva y el suero, y/o en el tejido o la célula tumoral. El nivel se puede comparar con un patrón u control adecuado, tal como una muestra comparable de un sujeto que no tiene la enfermedad asociada con HA.

15 Como se emplea en la presente memoria, una puntuación de HA se refiere a una puntuación semicuantitativa de los niveles de positividad de HA en miembros celulares y estroma de tumores. La puntuación se puede determinar mediante la detección de HA en tejido tumoral, tal como tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina, mediante métodos de histoquímica, tales como inmunohistoquímica o pseudoinmunohistoquímica, para HA utilizando una proteína de unión a hialuronano (HABP), (también referida a como hialadherinas). El grado de tinción en las células y el estroma se puede determinar visualmente con un microscopio o mediante programas y soportes lógicos de algoritmos informáticos disponibles. Por ejemplo, las imágenes se pueden analizar cuantitativamente utilizando un algoritmo de recuento de píxeles para la tinción de HA (p. ej., Aperio Spectrum Software y otros métodos convencionales que miden o cuantifican o semi-cuantifican el grado de tinción). En tal ejemplo, se puede calcular y puntuar una razón de tinción positiva fuerte (tal como la tinción de color marrón) con respecto a la suma del área total teñida, donde si la razón es más de 25% de tinción positiva fuerte con respecto a la tinción total, se puntúa el tejido tumoral como HA⁺³, si la razón es de 10-25% de tinción positiva fuerte con respecto a la tinción total, el tejido del tumor se califica como HA⁺², si la razón es inferior a 10% de tinción positiva fuerte con respecto a la tinción total, el tejido del tumor se califica como HA⁺¹, y si la razón de tinción positiva fuerte con respecto a la tinción total es 0, el tejido tumoral se califica como 0. El método de Aperio, así como el soporte lógico correspondiente, son conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 8.023.714; la Patente de Estados Unidos Núm. 7.257.268). Un tumor se clasifica o puntúa como HA^{Alto} (HA⁺³) a una fuerte tinción de HA por encima de 25% de la sección del tumor; como HA^{Moderado} (HA⁺²) a fuerte tinción de HA entre 10 y 25% de la sección del tumor; y como HA^{Bajo} (HA⁺¹) a una fuerte tinción de HA en 10% de la sección del tumor.

35 Como se emplea en la presente memoria, "HA moderado" con referencia a la cantidad o nivel de HA en una muestra de tejido o fluido corporal se refiere al grado o la extensión de HA en la muestra de tejido o fluido corporal en comparación con una muestra de tejido o fluido corporal normal o sano muestra. La cantidad de HA es moderada si la cantidad es aproximadamente 1,3 a 2 veces o mayor que la cantidad o nivel de HA en un tejido normal, de control o sano correspondiente. Se entiende que la cantidad de HA se puede determinar y cuantificar o semicuantificar utilizando métodos tales como ensayos de unión en fase sólida o histoquímica. Por ejemplo, la cantidad se puede basar en la comparación de los niveles plasmáticos o en la comparación de la intensidad de la tinción (p. ej., porcentaje de píxeles positivos) según lo determinado por la histoquímica. Por ejemplo, existe un HA moderado si la puntuación de HA por histoquímica u otro método es HA⁺² y/o si hay tinción de HA por encima de 10-25% de la sección del tumor. Por ejemplo, existe un HA moderado si existe una razón de tinción positiva fuerte (tal como tinción de color marrón) con respecto a la suma del área total teñida que es más de 25% de tinción positiva fuerte con respecto a la tinción total del tejido tumoral.

50 Como se emplea en la presente memoria, "HA alto" con referencia a la cantidad o nivel de HA en una muestra de tejido o fluido corporal se refiere al grado o extensión de HA en la muestra de tejido o fluido corporal en comparación con una muestra de tejido o fluido corporal normal o sano. La cantidad de HA es alta si la cantidad es al menos o al menos aproximadamente 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 pliegue, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces o más la cantidad o el nivel de HA en un tejido normal, de control o sano correspondiente. Se entiende que la cantidad de HA se puede determinar y cuantificar o semicuantificar utilizando métodos tales como ensayos de unión en fase sólida o histoquímica. Por ejemplo, la cantidad se puede basar en la comparación de los niveles plasmáticos o la comparación de la intensidad de la tinción (p. ej., porcentaje de píxeles positivos) según lo determinado por la histoquímica. Por ejemplo, existe un HA alto si la puntuación de HA por histoquímica u otro método es HA⁺³ y/o si hay tinción de HA de más de 25% de la sección del tumor. Por ejemplo, existe un HA alto si hay una razón de tinción fuerte (tal como tinción de color marrón) con respecto a la suma del área total teñida que es más de 25% de tinción positiva fuerte con respecto a la tinción total del tejido tumoral.

60 Como se emplea en la presente memoria, una "proteína de unión a hialuronano" (proteína de unión a HA, HABP o hialadherina) se refiere a cualquier proteína que se une específicamente a HA para permitir la detección del HA. La afinidad de unión es aquella que tiene como constante de asociación una Ka que es al menos aproximadamente o

es al menos 10^7 M^{-1} . La proteína de unión a HA puede ser una proteína producida de forma recombinante o sintética, o puede ser una proteína derivada de una fuente biológica o fuente fisiológica, tal como el cartílago. Las proteínas de unión a HA incluyen dominios de unión a HA, que incluyen módulos de enlace que se unen a HA y porciones suficientes de los mismos que se unen específicamente a HA para permitir su detección. Por lo tanto, las HABP incluyen cualquier proteína que contenga una región o dominio de unión a hialuronano o una porción suficiente de los mismos para unirse específicamente a HA. Las regiones de unión a hialuronano ilustrativas son módulos de enlace (dominios de enlace) o dominios G1. Una porción suficiente incluye al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o más aminoácidos contiguos de un dominio de unión o módulo de enlace adicional. Las proteínas de unión a HA también incluyen proteínas de fusión que contienen una proteína de unión a HA y uno o más polipéptidos adicionales, incluidos los dominios de multimerización. Las proteínas de unión a HA ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, agrecano, versicano, neurocano, brevicano, fosfacano, TSG-6, mutantes de TSG-6, tales como los proporcionados en la presente memoria, incluyendo polipéptidos que contienen dominios de unión a HA y módulos de enlace de los mismos que se unen a HA.

Como se emplea en la presente memoria, "dominio de unión a hialuronano" o "dominio de unión a HA" se refiere a una región o dominio de un polipéptido HABP que se une específicamente a hialuronano con una afinidad de unión que tiene una constante de asociación K_a que es al menos aproximadamente o es al menos 10^6 M^{-1} o 10^7 M^{-1} o mayor o una constante de disociación K_d que es menos que 10^{-6} M o 10^{-7} M o menos. Los dominios de unión a hialuronano ilustrativos incluyen, por ejemplo, módulos de enlace (también llamados dominios de enlace en la presente memoria) o dominios G1, o porciones suficientes de un módulo de enlace o dominio G1 que se unen específicamente a HA.

Como se emplea en la presente memoria, "multímero" en referencia a una proteína de unión a hialuronano se refiere a una HABP que contiene múltiples sitios de unión a HA, por ejemplo, al menos 2, 3 o 4 sitios de unión a HA. Por ejemplo, un multímero de HABP se refiere a una HABP que contiene al menos 2 módulos de enlace que son capaces de unirse cada uno a HA. Por ejemplo, se puede generar un multímero ligando, directa o indirectamente, dos o más módulos de enlace (p. ej., módulo de enlace TSG-6). El enlace se puede facilitar utilizando un dominio de multimerización, como una proteína Fc.

Como se emplea en la presente memoria, un "dominio de multimerización" se refiere a una secuencia de aminoácidos que promueve una interacción estable de una molécula polipeptídica con otra molécula polipeptídica que contiene un dominio de multimerización complementario, que puede ser el mismo dominio de multimerización o uno diferente para formar un multímero estable con el primer dominio. En general, un polipéptido se une directa o indirectamente al dominio de multimerización. Los dominios de multimerización ilustrativos incluyen las secuencias de inmunoglobulina o porciones de las mismas, cremalleras de leucina, regiones hidrófobas, regiones hidrófilas, dominios de interacción proteína-proteína compatibles, tales como, pero no limitados a, una subunidad R de PKA y un dominio de anclaje (AD), un tiol libre que forma un enlace disulfuro intermolecular entre dos moléculas y una protuberancia en cavidad (es decir, botón en ojal) y una cavidad compensatoria de tamaño idéntico o similar que forma multímeros estables. El dominio de multimerización, por ejemplo, puede ser una región constante de inmunoglobulina. La secuencia de inmunoglobulina puede ser un dominio constante de inmunoglobulina, tal como el dominio Fc o porciones del mismo de los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD e IgM.

Como se emplea en la presente memoria, "Fc" o "región Fc" o "dominio Fc" se refiere a un polipéptido que contiene la región constante de una cadena pesada de anticuerpo, excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgE, o los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM. Opcionalmente, un dominio Fc puede incluir toda o parte de la bisagra flexible N-terminal con respecto a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Un dominio Fc de IgG ilustrativo contiene los dominios de inmunoglobulina Cy2 y Cy3, y opcionalmente toda o parte de la bisagra entre Cy1 y Cy2. Los límites de la región Fc pueden variar, pero típicamente incluyen al menos parte de la región bisagra. Además, Fc también incluye cualquier variante alélica o de especie o cualquier variante o forma modificada, tal como cualquier variante o forma modificada que altera la unión a un FcR o altera una función efectora mediada por Fc. Se conocen secuencias ilustrativas de otros dominios Fc, incluyendo los dominios Fc modificados.

Como se emplea en la presente memoria, los niveles o valores normales se pueden definir de diversas maneras conocidas por los expertos en la técnica. Normalmente, los niveles normales se refieren a los niveles de expresión de un HA en una población sana. Los niveles normales (o niveles de referencia) se basan en mediciones de sujetos sanos, tal como a partir de una fuente específica (es decir, sangre, suero, tejido u otra fuente). A menudo, un nivel normal se especificará como un "intervalo normal", que generalmente se refiere al intervalo de valores de la mediana del 95% de la población sana. El valor de referencia se utiliza indistintamente en la presente memoria con el nivel normal, pero puede ser diferente de los niveles normales según los sujetos o la fuente. Los niveles de referencia suelen depender de los niveles normales de un segmento particular de la población. Por lo tanto, para los fines de la presente memoria, un nivel normal o de referencia es un patrón o control predeterminado por medio del cual se puede comparar un paciente de prueba.

Como se emplea en la presente memoria, "nivel elevado" se refiere a cualquier nivel de cantidad o expresión de HA

por encima de un umbral normal o citado.

Como se emplea en la presente memoria, "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra obtenida de una fuente viva o viral u otra fuente de macromoléculas y biomoléculas, e incluye cualquier tipo de célula o tejido de un sujeto del cual se puede obtener ácido nucleico o proteína u otra macromolécula. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra que se procesa. Por ejemplo, los ácidos nucleicos aislados que se amplifican constituyen una muestra biológica. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, fluidos corporales, como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos de animales, incluidas muestras de biopsias de tumores.

Como se emplea en la presente memoria, "detección" incluye métodos que permiten la visualización (a simple vista o con un aparato) de una proteína. Una proteína se puede visualizar utilizando un anticuerpo específico de la proteína. La detección de una proteína también se puede facilitar mediante la fusión de una proteína con una etiqueta que incluye una etiqueta o marca epitópica.

Como se emplea en la presente memoria, "tratar" a un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto se alivian parcial o totalmente, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento incluye profilaxis, terapia y/o cura. La profilaxis se refiere a la prevención de una enfermedad potencial y/o a la prevención del empeoramiento de los síntomas o la progresión de una enfermedad.

Como se emplea en la presente memoria, un "agente farmacéuticamente eficaz" incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, incluyendo, pero no limitados a, agentes quimioterapéuticos, anestésicos, vasoconstrictores, agentes dispersantes, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo fármacos de molécula pequeña y proteínas terapéuticas.

Como se emplea en la presente memoria, "tratamiento" significa cualquier manera en que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, mejoran o se modifican de manera beneficiosa.

Como se emplea en la presente memoria, "efecto terapéutico" significa un efecto que resulta del tratamiento de un sujeto que altera, típicamente mejora o alivia los síntomas de una enfermedad o afección o que cura una enfermedad o afección. Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de una composición, molécula o compuesto que da como resultado un efecto terapéutico tras la administración a un sujeto.

Como se emplea en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un animal, incluyendo un mamífero, tal como un ser humano.

Como se emplea en la presente memoria, un "paciente" se refiere a un sujeto humano que presenta síntomas de una enfermedad o trastorno.

Como se emplea en la presente memoria, "aproximadamente lo mismo" significa dentro de una cantidad que un experto en la técnica consideraría que es la misma o está dentro de un intervalo aceptable de error. Por ejemplo, típicamente, para composiciones farmacéuticas, dentro de al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5% o 10% se considera aproximadamente lo mismo. Tal cantidad puede variar dependiendo de la tolerancia a la variación en la composición particular de los sujetos.

Como se emplea en la presente memoria, "régimen de dosificación" se refiere a la cantidad de agente, por ejemplo, la composición que contiene un agente anti-hialuronano, por ejemplo una hialuronidasa soluble u otro agente, administrado, y la frecuencia de administración. El régimen de dosificación es una función de la enfermedad o afección que se vaya a tratar, y por lo tanto puede variar.

Como se emplea en la presente memoria, la "frecuencia" de administración se refiere al tiempo entre administraciones sucesivas de tratamiento. Por ejemplo, la frecuencia puede ser de días, semanas o meses. Por ejemplo, la frecuencia puede ser más de una vez por semana, por ejemplo, dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces por semana o diariamente. La frecuencia también puede ser de una, dos, tres o cuatro semanas. La frecuencia particular es una función de la enfermedad o afección particular tratada. Generalmente, la frecuencia es más de una vez por semana, y generalmente es dos veces por semana.

Como se emplea en la presente memoria, un "ciclo de administración" se refiere al programa repetido del régimen de dosificación de administración de la enzima y/o un segundo agente que se repite en administraciones sucesivas. Por ejemplo, un ciclo de administración ilustrativo es un ciclo de 28 días con administración dos veces por semana durante tres semanas, seguido de una semana de interrupción de la dosificación.

Como se emplea en la presente memoria, cuando se hace referencia a la dosificación basada en mg/kg del sujeto,

se considera que un sujeto humano promedio tiene una masa de aproximadamente 70 kg a 75 kg, tal como 70 kg y un área de superficie corporal (ASC) de 1,73 m².

- 5 Como se emplea en la presente memoria, el alivio de los síntomas de una enfermedad o trastorno particular mediante un tratamiento, tal como la administración de una composición farmacéutica u otro agente terapéutico, se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas o, los efectos adversos de una afección, tal como, por ejemplo, la reducción de los efectos adversos asociados con, o que se producen tras, la administración de un agente anti-hialuronano, tal como una hialuronidasa PEGilada.
- 10 Como se emplea en la presente memoria, "prevención" o "profilaxis" se refiere a la reducción del riesgo de desarrollar una enfermedad o afección.
- 15 Como se emplea en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosis terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Por lo tanto, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, aliviar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.
- 20 Como se emplea en la presente memoria, "forma de dosis unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y empaquetadas individualmente como se conoce en la técnica.
- 25 Como se emplea en la presente memoria, una formulación de dosificación única se refiere a una formulación como una dosis única.
- 30 Como se emplea en la presente memoria, la formulación para administración directa significa que la composición no requiere dilución adicional para la administración.
- 35 Como se emplea en la presente memoria, un "artículo de manufactura" es un producto que se fabrica y se vende. Como se emplea a lo largo de esta solicitud, se pretende que el término abarque agentes anti-hialuronano, por ejemplo, enzima de degradación de hialuronano, tal como la hialuronidasa, y composiciones inhibidoras de puntos de control inmunitario contenidas en artículos empaquetados.
- 40 Como se emplea en la presente memoria, "fluido" se refiere a cualquier composición que pueda fluir. De este modo, los fluidos abarcan composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones similares.
- 45 Como se emplea en la presente memoria, un "kit" se refiere a una combinación de componentes, como una combinación de las composiciones de la presente memoria y otro elemento para un propósito que incluye, pero no se limita a, la reconstitución, activación y aparatos/dispositivos para el suministro, administración, diagnóstico, y valoración de una actividad o propiedad biológicas. Los kits incluyen opcionalmente instrucciones de uso.
- 50 Como se emplea en la presente memoria, un extracto o producto lisado celular se refiere a una preparación o fracción que se elabora a partir de una célula lisada o alterada.
- 55 Como se emplea en la presente memoria, la sangre periférica es la sangre que se puede extraer de una vena y/o arteria. La recogida de sangre periférica puede ser distal o proximal a una región de interés, tal como un tumor.
- 60 Como se emplea en la presente memoria, animal incluye cualquier animal, tal como, pero no limitado a, primates, incluyendo seres humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves de corral, tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen a los humanos como animal contemplado. Las hialuronidasas proporcionadas en la presente memoria provienen de cualquier fuente, animal, vegetal, procariótica y fúngica. La mayoría de las hialuronidasas son de origen animal, incluyendo el origen de mamífero. Generalmente las hialuronidasas son de origen humano.
- 65 Como se emplea en la presente memoria, los tratamientos anti-cancerosos incluyen la administración de fármacos y otros agentes para tratar el cáncer, y también los protocolos de tratamiento, tales como la cirugía y la radiación. Los tratamientos anti-cancerosos incluyen la administración de agentes contra el cáncer.
- 70 Como se emplea en la presente memoria, un agente anti-canceroso se refiere a cualquier agente o compuesto utilizado en el tratamiento contra el cáncer. Estos incluyen cualquier agente, cuando se utilizan solos o combinados con otros compuestos, que pueden aliviar, reducir, mejorar, prevenir o colocar o mantener en un estado de remisión de síntomas clínicos o marcadores de diagnóstico asociados con tumores y cáncer, y se pueden utilizar en combinaciones y composiciones proporcionadas en la presente memoria. Los agentes anticancerosos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, enzimas de degradación de hialuronano, tales como las enzimas de degradación de hialuronano PEGiladas proporcionadas en la presente memoria utilizadas individualmente o combinadas con otros

agentes anticancerosos, tales como agentes quimioterapéuticos, polipéptidos, anticuerpos, péptidos, pequeñas moléculas o vectores de terapia génica, virus o ADN.

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

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

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

20 Como se emplea en la presente memoria, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia que se describe posteriormente ocurre o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

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

B. Terapia combinada de inhibidor de puntos de control inmunitario y enzimas de degradación de hialuronano

30 En la presente memoria se proporcionan terapias combinadas de acuerdo con las presentes reivindicaciones para su uso en el tratamiento de cánceres que incluyen un agente anti-hialuronano, una enzima de degradación de hialuronano (p. ej., una hialuronidasa soluble, tal como una PH20), y un agente que aumenta la respuesta inmunitaria mediante el bloqueo de una proteína de puntos de control inmunitario (es decir, inhibidor de puntos de control inmunitario). El agente anti-hialuronano, una enzima de degradación de hialuronano (p. ej., una hialuronidasa soluble, tal como PH20), se modifica o se formula o se proporciona para mostrar una mayor semi-vida en el plasma. Generalmente, la enzima de degradación de hialuronano se modifica por conjugación con un polímero. Como se describe en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano se puede formular para la liberación sostenida o la liberación o el suministro locales, tal como en un vector que lo codifica.

40 Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan terapias combinadas para su uso en el tratamiento de cánceres. Las combinaciones incluyen una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, es decir, una hialuronidasa, tal como PEGPH20, y un agente que aumenta la respuesta inmunitaria al bloquear una proteína de puntos de control inmunitario (es decir, inhibidor de puntos de control inmunitario). En las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo dirigido contra una proteína de puntos de control inmunitario, es decir, un anticuerpo dirigido contra el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4 o CD152) o el ligando 1 de muerte celular programada (PDL-1) o la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1).

50 En particular, la terapia combinada proporcionada en la presente memoria se utiliza en el tratamiento de cualquier cáncer caracterizado por tumores sólidos que tienen un fenotipo de hialuronano (HA) al menos moderado a alto, y también de tumores sólidos estromales. Los cánceres ilustrativos incluyen cánceres de tumores sólidos, tales como, pero no limitados a, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no escamosas (CPCNE), cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello y otros. La terapia combinada puede incluir adicionalmente un fármaco quimioterapéutico citotóxico adicional o una terapia con radionúclidos o cirugía, tal como resección quirúrgica.

1. Tumores sólidos y respuesta inmunitaria

60 Muchos cánceres desarrollan mecanismos para evadir las respuestas inmunitarias antitumorales. Estos mecanismos pueden ser intrínsecos a las células tumorales o estar mediados por otras células. Los mecanismos intrínsecos a las células tumorales incluyen la pérdida de expresión de antígenos que provocan respuestas inmunitarias. Por ejemplo, la alta tasa mitótica y la inestabilidad genética de las células tumorales, en presencia de un sistema inmunológico del anfitrión que funciona, pueden conducir a la selección de mutaciones o deleciones de genes que codifican antígenos tumorales que no son necesarios para el crecimiento de los tumores o el mantenimiento del fenotipo transformado.

Por ejemplo, algunas células tumorales no expresan co-estimuladores, tales como CD80 y CD86, necesarios para las respuestas de las células T o las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, que son necesarias para la activación de las células T auxiliares. Al eliminar los antígenos o prevenir la expresión de los ligandos que se requieren para la activación inmunitaria, las células tumorales pueden evadir las respuestas inmunitarias mediadas por células T.

Las células tumorales también pueden suprimir las respuestas anti-tumorales mediante la secreción de citoquinas inmunosupresoras, tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que puede inhibir la proliferación y las funciones efectoras de los linfocitos y macrófagos.

Los tumores también pueden evadir la respuesta inmunitaria al inhibir el acceso de las células inmunitarias a los antígenos tumorales. Por ejemplo, los antígenos tumorales pueden ser enmascarados frente al sistema inmunológico mediante la expresión de moléculas de glicocáliz, tales como los mucopolisacáridos que contienen ácido siálico, sobre la superficie de la célula tumoral. Además, los tumores, tales como los tumores sólidos, están formados por células cancerosas y células del estroma (p. ej., fibroblastos y células inflamatorias) que están rodeadas por una matriz extracelular y una red vascular. Las células estromales, los componentes de la matriz extracelular y/o la vasculatura generalmente son anormales en comparación con los presentes en los tejidos normales. Por ejemplo, muchos tumores sólidos tienen un mayor número de fibroblastos en comparación con los tejidos normales. Además, la vasculatura en los tumores sólidos puede mostrar una estructura ramificada o enroscada en comparación con la vasculatura normal, y mostrar aberraciones estructurales caracterizadas por vasos dilatados, reducción del revestimiento endotelial y/o vasos comprimidos. Finalmente, las células tumorales y estromales producen y ensamblan una red compleja de componentes de la matriz extracelular, tales como colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (p. ej., hialuronano) y otras moléculas que forman una masa densa y pueden contribuir a la alta presión intersticial del tumor. La alta presión del fluido intersticial por encima de la presión intravascular en las arteriolas y capilares terminales puede afectar la perfusión de los fluidos y solutos al intersticio y evitar el acceso de las células de la respuesta inmunitaria, tales como los linfocitos infiltrantes de tumores, a la superficie del tumor.

2. Modulación de puntos de control inmunitario de la actividad de las células T en tumores

En condiciones fisiológicas normales, la respuesta inmunitaria mediada por células T se inicia mediante el reconocimiento de antígenos por el receptor de células T (TCR) y se regula mediante un equilibrio de señales co-estimuladoras e inhibitoras (es decir, proteínas de puntos de control inmunitario). El sistema inmunológico se basa en puntos de control inmunitario para prevenir la autoinmunidad (es decir, la auto-tolerancia) y para proteger los tejidos del daño excesivo durante una respuesta inmunitaria, por ejemplo, durante un ataque contra una infección por patógenos. En algunos casos, sin embargo, las proteínas de puntos de control inmunitario pueden estar desreguladas en los tumores como un mecanismo para evadir el sistema inmunológico.

Las terapias para tratar el cáncer incluyen inmunoterapias (p. ej., antagonistas o agonistas de proteínas de puntos de control inhibitoras) que inhiben la señalización inmunosupresora o aumentan la señalización inmunoestimuladora. En lugar de dirigirse directamente al tumor en sí, tales terapias utilizan las defensas endógenas del anfitrión para combatir el tumor. Por ejemplo, los antagonistas y/o agonistas de proteínas de puntos de control inhibitoras de los receptores co-estimuladores pueden estimular la respuesta inmunitaria antitumoral endógena de un anfitrión al amplificar las respuestas de las células T específicas del antígeno. La potenciación de la respuesta inmunitaria del anfitrión ofrece ventajas sobre las terapias citotóxicas, ya que los efectos pueden durar mucho tiempo, de modo que el sujeto puede desarrollar una respuesta anti-tumoral duradera que puede persistir durante meses o años después de la interrupción del tratamiento.

En ejemplos particulares, las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria emplean un agente (es decir anticuerpo) que se dirige a una proteína de puntos de control inhibitora. Las proteínas diana de puntos de control inmunitario inhibitoras y los anticuerpos terapéuticos para las dianas se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Proteínas diana e inhibidores de los puntos de control inmunitarios ilustrativos

Diana	Función diana	Anticuerpo/proteína de fusión	Sinónimos y nombres de código
CTLA4	Receptor inhibidor	Ipilimumab	(MDX-CTLA-4; BMS-734016; MDX-010)
		Tremelimumab	(ticilimumab; CP-675,206)
PD-1	Receptor inhibidor	MK-3475	(Pembrolizumab; Lambrolizumab; SCH 900475)
		AMP-224	(proteína de fusión anti-PD-1 AMP-224)
		Nivolumab	(BMS-936558; MDX-1106; ONO-4538)

Tabla 3. Proteínas diana e inhibidores de los puntos de control inmunitarios ilustrativos			
Diana	Función diana	Anticuerpo/proteína de fusión	Sinónimos y nombres de código
		Pdilizumab	(CT-011)
PD-L1	Ligando para PD-1	MDX-1105	
		BMS-936559	(RG7446)
		Med14736	
		MPDL33280A	

En particular, se contemplan inhibidores de las moléculas inhibidoras inmunológicas CTLA4 y PD-1 para las combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria. Mientras CTLA4 y PD-1 funcionan como reguladores negativos, cada uno desempeña un papel no redundante en la modulación de las respuestas inmunitarias: CTLA-4 participa en la atenuación de la activación temprana de células T no activadas "no sometidas a tratamiento previo" y de memoria (en reposo); mientras que PD-1 desempeña un papel en la modulación de la actividad de las células T en los tejidos periféricos (véase, p. ej., Keir et al. (2008) Annu Rev Immunol. 26:677-704; Pardoll, (2012) Nat Rev Cancer. 12 (4):252-264; Quezada et al., (2013) Br J Cancer. 108 (8): 1560-1565; Callahan et al., (2010) Semin Oncol. 37 (5):473-84). Estas actividades, y la inhibición de estas dianas en la inmunoterapia de tumores, se describen con más detalle a continuación.

a. CTLA-4 y cebado de células T

La inmunidad mediada por células T implica las etapas de cebado, que se inician mediante la selección clonal de células T específicas de antígeno seguida de la activación y proliferación de células T seleccionadas en tejidos linfoides, el tráfico de células T activadas a sitios de antígeno e inflamación, y la ejecución de funciones efectoras directas en células diana. Cada una de estas etapas está regulada por las señales estimuladoras e inhibidoras compensatorias que afinan la amplitud de la respuesta inmunitaria.

El cebado de células T, que incluye las etapas consecutivas de selección de células T específicas de antígeno y activación y proliferación de las células T seleccionadas, se produce en los ganglios linfáticos. Las células T no activadas y en reposo expresan el receptor de células T (TCR) y altos niveles del receptor coestimulador, CD28 sobre la superficie celular. Los TCR se unen a péptidos antigénicos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC), tal como una célula dendrítica o macrófago. Las APC también expresan CD80 (también llamado B7.1) o CD86 (también llamado B7.2), los ligandos para CD28. Tras la unión de TCR a su péptido: el antígeno MHC y el reconocimiento de CD80 o CD86 por el receptor de células T coestimulador, CD28, expresado sobre las células T, se produce una transducción de señales dentro de las células T para iniciar la activación de las células T.

El antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA4; también llamado CD152) es un receptor co-inhibidor que se empaqueta en vesículas que se mantienen en el citoplasma de las células T no activadas o en reposo. Cuando la transducción de señales iniciada por CD28 inicia la activación de las células T, también desencadena el transporte de las vesículas que contienen CTLA4 a la superficie de la célula T. CTLA4 compete con CD28 para unirse a CD80 y CD86 sobre las APC, y CTLA4 tiene una afinidad de unión más alta para los antígenos que CD28. La actividad inhibidora de CTLA4 actúa amortiguando la amplitud de la señal estimuladora de CD28. Por lo tanto, la activación y proliferación de células T depende de la razón de las señales de CD28 (estimulador) con respecto a CTLA4 (inhibidor). En este papel, CTLA4 funciona reduciendo la actividad de las células T y, por lo tanto, limitando la autoinmunidad. CTLA4 también desempeña un papel en la modulación descendente de la actividad de las células T auxiliares y en la mejora de la actividad de las células T reguladoras (T_{reg}).

La erradicación de tumores puede ocurrir al destruir las células tumorales por medio de los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para antígenos tumorales. Las células T auxiliares CD4+ también pueden desempeñar un papel en la respuesta inmunitaria a los tumores activando células efectoras específicas de antígeno y reclutando células del sistema inmunitario innato hacia el tumor, tales como los macrófagos. La mayoría de los tumores, sin embargo, pueden evadir el sistema inmunológico. Esto puede ocurrir por el fallo de los tumores para expresar antígenos que puedan ser reconocidos por el sistema inmunológico. Además, muchos tumores pueden expresar aberrantemente moléculas co-estimuladoras e inhibidoras de modo que, en general, hay una activación reducida de CTL y células T auxiliares. Por ejemplo, los tumores pueden expresar niveles bajos de la molécula coestimuladora CD80 o CD86, lo que da como resultado un compromiso preferencial del receptor inhibidor CTLA-4 en lugar del receptor estimulador CD28. Además, algunos tumores pueden inducir células T reguladoras, que también suprimen las respuestas inmunitarias antitumorales.

La inhibición de CTLA4, por ejemplo administrando anticuerpos anti-CTLA4, puede mejorar la respuesta inmunitaria al aumentar la actividad de los CTL, aumentando la presencia de células T efectoras y auxiliares y/o inhibiendo las funciones supresoras de las células T_{reg}. La inhibición de CTLA4 permite la activación completa de las células T durante la fase de cebado de la respuesta inmunitaria.

Como se indica en la Tabla 3 anterior, dos anticuerpos que bloquean CTLA4, Ipilimumab y Tremelimumab, se han utilizado para el tratamiento eficaz de algunos cánceres, tales como el melanoma, el cáncer de páncreas, el cáncer de ovario, el cáncer de próstata, el cáncer de células renales (CCR), el cáncer colorrectal (CCR), el cáncer gástrico y CPCNP (véase Kyi et al., (2014) FEBS Letters 588: 368-376 para una revisión). El bloqueo terapéutico de CTLA4 puede efectuar una regresión del tumor de meses a años después de completar la terapia (Prieto et al., (2012) Clin Cancer Res. 18(7):2039-2047; Kirkwood et al., (2010) Clin Cancer Res. 16(3):1042-1048), pero también puede reducir la tolerancia a otros tejidos del anfitrión, lo que lleva a eventos adversos, tales como los eventos adversos relacionados con el sistema inmunológico (irAE).

b. PD-1 y fase efectora de células T

Después de la activación en el ganglio linfático, las células T activadas ingresan al torrente sanguíneo y viajan a los tejidos periféricos para llevar a cabo las funciones efectoras de las células T. La expresión de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), un receptor que inhibe la activación de las células T, se induce con la activación de las células T. PD-1 también está presente en las células T reguladoras (T_{reg}), células T agotadas, células B activadas, células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DC) y monocitos activados.

PD-1 tiene dos ligandos principales, el ligando 1 de PD-1 (PD-L1; también llamado B7-H1 o CD274) y PD-L2 (también llamado B7-DC o CD273). Las señales inflamatorias en los tejidos inducen la expresión de PD-L1 y PD-L2. Al unirse a uno de sus ligandos, PD-1 actúa atenuando la actividad de las células T, al inhibir la señalización del receptor de células T (TCR), regulando por disminución la secreción de citoquinas inmunoestimuladoras y la expresión de proteínas de supervivencia, y aumentando la producción de células T de la citoquina inmunosupresora IL-10. Estas actividades sirven para limitar el daño colateral al tejido y limitar la autoinmunidad durante una respuesta inmunitaria en condiciones normales.

Múltiples tumores y células en el microentorno del tumor de cánceres tales como cánceres de ovario, urotelial, de mama, cervical, de colon, pancreático, gástrico, melanoma, glioblastoma y CPCNP, expresan PD-L1 y/o PD-L2 (Zou y Chen, (2008) Nat. Rev. Immunol. 8(6):467-477; Rozali et al., (2012) Clin Dev Immunol. 2012: 656340). Cuando PD-1 se une a su ligando sobre las células tumorales, la actividad de las células T se atenúa, lo que evita el rechazo del tumor y, por lo tanto, contribuye a la evasión inmunitaria del tumor. La expresión de PD-L1 por tumores se ha relacionado con un mal pronóstico en varios cánceres (Hamid y Carvajal, (2013) Expert Opin Biol Ther. 13(6):847-861).

El bloqueo de la ruta de señalización de PD-1 da como resultado la restauración de las funciones efectoras de las células T, tales como las funciones efectoras de las células T específicas del tumor, tal como la destrucción de células tumorales y la secreción de citoquinas inmunoestimuladoras, tales como el interferón gamma (IFN γ), la interleuquina-2 (IL -2) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Se pueden utilizar terapias, incluyendo terapias que emplean anticuerpos monoclonales, tales como las que se muestran anteriormente en la Tabla 3, para bloquear la interacción entre PD-1 y PD-L1 o PD-L2 como una estrategia para aumentar la respuesta inmunitaria antitumoral. Los anticuerpos anti-PD-1 que interrumpen la señalización de PD-1 incluyen Nivolumab, MK-3745 y Pidilizumab.

c. Otros agentes inmunomoduladores

Otros ligandos y receptores de puntos de control inmunitario participan en la modulación de la respuesta inmunitaria y pueden ser dianas de terapias dirigidas a mejorar la inmunidad antitumoral. Adicionalmente, el bloqueo de dos o más de los receptores o ligandos expresados de manera coordinada puede producir actividades antitumorales aditivas o sinérgicas.

Las dianas incluyen ligandos inhibidores de B7, distintos de PD-L1 y PD-L2, tales como B7-H3 y B7-H4, que están regulados por aumento en células tumorales o células infiltrantes de tumores. Otras dianas, que están asociadas con la inhibición de la actividad de los linfocitos, incluyen el gen 3 de activación de los linfocitos (LAG3; también llamado CD223), 2B4 (también llamado CD244), atenuador de linfocitos B y T (BTLA; o CD272), proteína 3 de la membrana de la célula T (TIM3; o HAVcr2), receptor de adenosina A2a (A2aR) y la familia de los receptores inhibidores de las células asesinas. Muchos de estos receptores de puntos de control inmunitario regulan la actividad de las células T efectoras y las células T_{reg}. Por ejemplo, LAG3 es altamente expresado en células T_{reg} (que ayudan a prevenir la autoinmunidad), donde se cree que es importante para amplificar la actividad inmunosupresora. LAG3 también se asocia con la inhibición de la actividad de las células T efectoras y puede inducir anergia de las células T (Pardoll, (2012) Nat Rev Cancer. 12(4):252-264. El direccionamiento de anticuerpos contra estas proteínas solas o combinadas puede mejorar la inmunidad antitumoral en modelos de cáncer en animales. Debido a que muchas

células tumorales expresan múltiples ligandos inhibidores, y a que los linfocitos que se infiltran en el tumor expresan múltiples receptores inhibidores, un enfoque combinatorio para inhibir estas proteínas puede ser eficaz para mejorar la inmunidad antitumoral (véase Pardoll, (2012) Nat Rev Cancer. 12(4):252-264 para una revisión).

- 5 Además de los ligandos inhibidores secretados o unidos a la membrana, las enzimas metabólicas tales como la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y la arginasa, que son expresadas por células supresoras derivadas de mieloides inhibidores que normalmente infiltran tumores, pueden inhibir localmente las respuestas inmunitarias mediante el agotamiento de los aminoácidos esencial para el metabolismo anabólico de las células T. Estas enzimas pueden ser inhibidas por fármacos de molécula pequeña.

10 3. Enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero en terapia combinada con un inhibidor de puntos de control inmunitario

15 El hialuronano (HA) es un componente importante de la matriz extracelular de los tumores sólidos. El HA es un glicosaminoglicano lineal de alto peso molecular que contiene unidades de disacáridos que se repiten, β -1,3-acetil-D-glucosamina unida β -1,4 a ácido D-glucurónico. El HA se produce naturalmente en el organismo y se secreta a niveles extremadamente altos en algunas células cancerosas, incluyendo células de cáncer de páncreas, pulmón (p. ej., PCNP), y mama. Se ha informado sobre aberraciones locales del metabolismo de HA en muchas neoplasias malignas de tumores sólidos, donde los niveles elevados de HA a menudo se correlacionan con un mal pronóstico

20 en tumores tales como el carcinoma de mama, gástrico, colorrectal, ovárico, de próstata y de pulmón. En particular, el HA participa en el aumento de absorción de agua y la presión del fluido intersticial (IFP) en los tejidos enfermos, tales como tumores, lo que da como resultado una vasculatura tumoral comprimida. Por ejemplo, en los sitios de inflamación o en un foco tumoral, hay una rápida acumulación de hialuronano, otros componentes de la matriz y agua. Debido a esta rápida acumulación, el sitio enfermo no puede alcanzar el equilibrio con su entorno y, por lo tanto, tiene una IFP más alta que los tejidos normales.

Como se comentó anteriormente, la IFP de la mayoría de los tumores sólidos y otros tejidos enfermos asociados con HA acumulado es elevada, actuando como una barrera para la administración eficaz de fármacos (Heldin et al. (2004) Nat Rev Cancer 4(10):806-813). La acumulación de HA también reduce la inhibición por contacto entre las

30 células tumorales (véase, p. ej., Itano et al. (2002) Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 99:3609-3614). Además de crear una barrera física, el hialuronano derivado del tumor también puede inducir macrófagos inmunosupresores a través de la activación temprana transitoria de los monocitos (Kuang et al., (2007) Blood 110 (2):587-595) permitiendo de ese modo que las células tumorales eviten la respuesta inmunitaria y creen condiciones para la progresión del tumor.

35 Las enzimas que degradan el hialuronano, tales como las enzimas hialuronidasas, son enzimas que interfieren en el ácido hialurónico y lo degradan. Las enzimas que degradan el hialuronano, p. ej., las hialuronidasas (p. ej., PH20), pueden reducir el hialuronano de manera que el tejido se desinfe, los vasos sanguíneos se expandan y más sangre pueda fluir a través del sitio. Esto produce como resultado una disminución de la presión del líquido intersticial en el sitio del tejido y un aumento asociado en la perfusión vascular. Además, las enzimas que degradan el hialuronano

40 (p. ej., la hialuronidasa soluble, por ejemplo, PH20) puede agotar el estroma que rodea las células cancerosas al degradar el HA. En virtud de los efectos para degradar el hialuronano, las enzimas que degradan el hialuronano (p. ej., la hialuronidasa soluble, por ejemplo, PH20) se han utilizado para el tratamiento de tumores y cánceres en la terapia de tratamiento único o en terapia combinada con otros agentes (véase p. ej., las Solicitudes publicadas de Estados Unidos Núm. US2006/0104968 y US20100003238; y la Solicitud de Publicación Internacional PCT Núm. WO 2009/128917).

El tratamiento de los tumores generalmente requiere administración sistémica. El uso de hialuronidasa, tal como una enzima PH20, como tratamiento sistémico adolece de problemas asociados con la corta semi-vida de la enzima. Por ejemplo, la hialuronidasa no modificada típicamente tiene una semi-vida corta de actividad enzimática en la sangre

50 de minutos, generalmente menos de 5 minutos. Esto significa que tales enzimas son generalmente inadecuadas para su uso en administraciones intravenosas y otras administraciones, donde su duración de acción es de corta duración. Esto se debe a que, después de la degradación, el sustrato de HA se reemplaza con una semi-vida de aproximadamente 5 h. En contraste, los métodos que aumentan la administración y/o prolongan la asociación de una hialuronidasa con hialuronano asociado a células (p. ej., hialuronano pericelular asociado al tumor) permite el

55 tratamiento de tumores ricos en HA (p. ej., tumores con HA^{alto}). Tales métodos pueden incluir, pero no se limitan a, la conjugación de la enzima con un polímero, el uso de una enzima que está aglicosilada o que esté modificada para presentar una reducción de la glicosilación, la infusión continua de la enzima y/o un suministro localizado de la enzima. Por ejemplo, la modificación con polímero de la hialuronidasa, tal como la PEGilación, aumenta la semi-vida de la enzima aproximadamente 48 a 72 horas y permite el tratamiento sistémico de tumores ricos en HA (véase p. ej., la Solicitud Publicada de Estados Unidos Núm. 20100003238 y la Solicitud Publicada Internacional PCT Núm. WO 2009/128917). El aumento de la semi-vida en relación con la hialuronidasa no modificada permite la eliminación continua de HA, y por lo tanto reduce o disminuye el grado de regeneración de HA en tejidos enfermos, tales como el tumor. Por lo tanto, el mantenimiento de los niveles de enzimas en plasma mediante la conjugación con polímeros puede eliminar el HA, tal como el HA del tumor, y también contrarrestar la resíntesis de HA.

En la presente memoria se encuentra que la terapia combinada de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, por ejemplo una hialuronidasa soluble PEGilada (p. ej., PEGPH20) y un inhibidor de puntos de control inmunitario muestra un aumento sustancial en la eficacia para el tratamiento de tumores (particularmente tumores HA^{alto}) que cualquiera de los agentes solo. En particular, tales resultados son evidentes cuando la enzima se administra previamente al sujeto antes de administrar el inhibidor de puntos de control inmunitario.

Dado que los inhibidores de puntos de control inmunitario actúan sobre las células inmunitarias para mejorar las respuestas inmunitarias, el incremento de la respuesta cuando se proporcionan combinados con una enzima de degradación de hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, puede deberse a efectos sobre el aumento de acceso de las células inmunitarias (p. ej., CTL) al tumor. Por ejemplo, como se describió anteriormente, las células tumorales y estromales producen y ensamblan una red compleja de componentes de la matriz extracelular, tales como colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (p. ej., hialuronano) y otras moléculas que forman una masa densa que puede inhibir la infiltración de linfocitos y otras células inmunitarias. Al degradar el hialuronano, puede haber un mayor acceso de las células inmunitarias circulantes a los tumores, lo que aumenta el número de células citotóxicas y otras inmunitarias disponibles para destruir las células tumorales. La penetración de agentes o fármacos antitumorales, tales como los inhibidores de puntos de control inmunitario (p. ej., anticuerpo anti-CTLA4), también se puede aumentar. También es posible que la degradación del hialuronano mejore el contacto superficial entre las células inmunitarias, tales como las células T citotóxicas y las células tumorales, lo que también produce como resultado una mayor destrucción de las células tumorales cuando se combina con un inhibidor de puntos de control inmunitario.

Por lo tanto, el uso de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, por ejemplo una hialuronidasa soluble PEGilada (p. ej., PEGPH20), tal como mediante la administración previa, puede sensibilizar un tumor a las respuestas mediadas por el sistema inmunológico, que pueden aumentar aún más en presencia de un inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., anticuerpo anti-CTLA4). La mejora de la accesibilidad de las células inmunitarias al tumor mediante una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, por ejemplo, como se logra mediante la administración previa de la enzima, puede permitir una dosificación reducida del inhibidor de puntos de control inmunitario, mientras se mantiene la eficacia terapéutica. La capacidad de ajustar con mayor eficacia la dosificación de anticuerpos puede producir una reducción de los eventos adversos que pueden estar asociados con la terapia con anticuerpos. Por lo tanto, la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede facilitar una respuesta inmunitaria antitumoral mejorada para la erradicación de tumores y el tratamiento de tumores.

C. Agentes de terapia combinada

En la presente memoria se proporcionan terapias combinadas de acuerdo con las presentes reivindicaciones que comprenden agentes anti-hialuronano, tales como enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímeros y otras formas de los mismos, tales como vesículas que contienen una enzima de degradación de hialuronano y un vector que lo codifica, y un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como los inhibidores de las proteínas de puntos de control inmunitario, tales como los anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD-1, para su uso en el tratamiento de cánceres. En particular, en la presente memoria se proporcionan terapias combinadas de una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, es decir, una hialuronidasa, tal como PEGPH20, e inhibidores de puntos de control inmunitario, tales como anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD-1, para su uso en el tratamiento de cánceres. Para los fines de las realizaciones en la presente memoria, la referencia a una enzima de degradación de hialuronano (p. ej., una hialuronidasa soluble, tal como PH20), incluye enzimas de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p. ej., polipéptidos de hialuronidasa solubles conjugados con polímeros, tales como PEGPH20). En particular, la terapia combinada proporcionada en la presente memoria se utiliza en el tratamiento de cualquier cáncer caracterizado por tumores sólidos que se caracterizan por tener niveles de HA de moderados a altos en la matriz extracelular (es decir, tumores HA^{moderado} a HA^{alto}). Los ejemplos de tales cánceres incluyen cánceres de tumores sólidos, tales como, pero no limitados a, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón y otros. La terapia combinada puede incluir adicionalmente un agente de direccionamiento inmunitario adicional, un fármaco quimioterapéutico citotóxico, radioterapia o tratamiento quirúrgico.

En las siguientes subsecciones se proporcionan ejemplos no limitantes de inhibidores de puntos de control inmunitario y agentes antihialuronano, incluidas las enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímeros, para su uso en la terapia combinada.

1. Inhibidores de puntos de control inmunitario y sus formulaciones

La terapia combinada, que incluye composiciones, combinaciones y métodos y uso de los mismos, proporcionada en la presente memoria contiene inhibidores de las proteínas de puntos de control inmunitario que bloquean una proteína de puntos de control inmunitario para estimular una respuesta inmunitaria antitumoral. Tales inhibidores de

puntos de control inmunitario son conocidos en la técnica. Los ejemplos de tales inhibidores se describen en la Sección B e incluyen cualquier anticuerpo inhibidor que se dirija a una proteína de puntos de control inhibidora descrita en la Tabla 3. Por ejemplo, la proteína o agente de puntos de control inmunitario es un inhibidor de CTLA4 y PD-1. El inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo. La Tabla 3 de la Sección B proporciona ejemplos no limitantes de inhibidores de puntos de control inmunitario. Los inhibidores ilustrativos de CTLA4 y PD-1 incluyen anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD-1.

El inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo que bloquea una molécula de puntos de control inmunitario (p. ej., anti-CTLA4 o anti-PD-1). El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera inmuno-específica a la molécula de punto control inmunitario (p. ej., CTLA4 o PD-1). Un anticuerpo completo contiene cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) idénticas (cada una usualmente contiene aproximadamente 440 aminoácidos) y dos cadenas ligeras (L) idénticas (cada una contiene aproximadamente 220 aminoácidos). Las cadenas de anticuerpos completos se organizan en dominios de región variable (V) y constante (C). Las cadenas ligeras tienen dos dominios, correspondientes a la región C (C_L) y la región V (V_L). Las cadenas pesadas tienen cuatro dominios, la región V (V_H) y tres o cuatro dominios en la región C (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}), y, en algunos casos, una región bisagra. Cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro, y las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro. La unión de las cadenas pesadas está mediada por una región flexible de la cadena pesada, conocida como la región bisagra.

Los dominios variables confieren especificidad de antígeno al anticuerpo a través de tres porciones llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HV). Las regiones CDR están definidas con precisión y numeradas universalmente en los anticuerpos (véanse p. ej., Kabat, E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH Núm. 91-3242 y Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; AbM (Martin et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9268-9272; Martin et al. (1991) *Methods Enzymol* 203: 121-153; Pedersen et al. (1992) *Immunomethods* 1: 126-136). Juntas, las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera forman un sitio de unión a antígeno (sitio de combinación con anticuerpo) del anticuerpo, que interactúa físicamente con el antígeno cognado y proporciona la especificidad del anticuerpo.

La región constante promueve la activación de células del complemento y efectoras. Al igual que las regiones CDR, las regiones constantes se definen con precisión y se numeran universalmente en anticuerpos utilizando el índice de UE y los esquemas de numeración de Kabat (véase p. ej., Kabat, E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH Núm. 91-3242). La región constante puede ser cualquier clase de inmunoglobulina (p. ej., IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY), cualquier subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o sub-subclase (p. ej., IgG2a e IgG2b). En ejemplos particulares, los anticuerpos en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria son anticuerpos completos que contienen una región constante de cadena pesada de IgG1 expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 288-292, una región constante de IgG2 expuesta en SEQ ID NO: 293, una región constante de IgG3 expuesta en SEQ ID NO: 294, o una región constante de IgG4 expuesta en SEQ ID NO: 295. Los anticuerpos en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también pueden contener una región constante de la cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ), tal como una región constante de la cadena ligera lambda humana expuesta en SEQ ID NO: 297, o una región constante de la cadena ligera kappa expuesta en SEQ ID NO: 296 o 298.

Para los fines de las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria, se puede emplear cualquier fragmento de unión a antígeno de un inhibidor de anticuerpo completo, tales como los derivados de anticuerpos completos que contienen menos que la secuencia completa de los anticuerpos completos pero que conservan al menos una porción de las capacidades de unión específica del anticuerpo completo (p. ej., las porciones variables de la cadena pesada y ligera) en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. Los fragmentos de anticuerpo también pueden incluir porciones de unión a antígeno de un anticuerpo que se pueden insertar en un marco de anticuerpo (p. ej., anticuerpos quiméricos) con el fin de conservar la afinidad de unión del anticuerpo parental. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd', y otros fragmentos, incluidos los fragmentos modificados (véase, por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, vol. 207: *Recombinant Antibodies for Cancer Therapy and Protocols* (2003); Capítulo 1; pág. 3-25, Kipriyanov). Los fragmentos de anticuerpos pueden incluir múltiples cadenas unidas entre sí, tales como por ejemplo mediante puentes disulfuro y se pueden producir de forma recombinante. Los fragmentos de anticuerpo también pueden contener conectores sintéticos, tales como conectores peptídicos, para conectar dos o más dominios. Los métodos para generar fragmentos de unión a antígeno son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar para modificar cualquier anticuerpo proporcionado en la presente memoria. Se pueden generar fragmentos de moléculas de anticuerpo, tales como por ejemplo, por escisión enzimática. Por ejemplo, tras la escisión de la proteasa por la papaína, un dímero de las regiones constantes de la cadena pesada, el dominio Fc, se escinde de las dos regiones Fab (es decir, las porciones que contienen las regiones variables).

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos y otras terapias con inhibidores de puntos de control inmunitario se proporcionan a continuación.

a. Terapias anti-CTLA4

Las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria, incluyendo las composiciones y combinaciones para su uso, incluyen anticuerpos terapéuticos que inhiben CTLA4. Los inhibidores incluyen anticuerpos y aptámeros. Se conocen inhibidores de anticuerpos y aptámeros que se unen a CTLA4 e inhiben la señalización de CTLA4. Se han descrito aptámeros ilustrativos (fuera del alcance de la invención) que se unen a CTLA4, inhiben la función de CTLA4 y potencian la inmunidad tumoral y se exponen en SEQ ID NO: 11-18 (Santulli-Marotto (2003) Cancer Res. 63(21):7483-7489; Gilboa et al., (2013) Clin Cancer Res 19(5):1054-1062).

Se han descrito varios anticuerpos, que se unen a, e inhiben la actividad de CTLA4, que se han utilizado en la inmunoterapia antitumoral. Los anticuerpos anti-CTLA4 incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.682.736, 6.984.720; las Publicaciones de EE.UU. Núm. 2002/0086014; 2009/0074787; la Patente Europea Núm. EP 1262193; y la Publicación de Patente Internacional Núm. WO 2000/037504. En particular, los anticuerpos anti-CTLA4 incluyen Ipilimumab (también llamado MDS-010 o 10D1) y Tremelimumab (también llamado Ticilimumab o CP-675,206). Estos anticuerpos anti-CTLA4 han participado en numerosos ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres. Ipilimumab está aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma y ha estado en ensayos clínicos para otros cánceres, tales como el cáncer de próstata, cáncer de pulmón y CCR. Tremelimumab se ha investigado en ensayos clínicos para el tratamiento de CCR, cáncer gástrico, melanoma y CPCNP.

(i) Ipilimumab y derivados del mismo

Un anticuerpo anti-CTLA4 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir Ipilimumab (también llamado MDX-010, MDX-101, 10D1; Núm. de Acceso del Banco de Fármacos DB06186) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de Ipilimumab. Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal IgG1k completamente humano que se une específicamente a CTLA4 humano (véanse, p. ej., anticuerpo designado 10D1 en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2002/0086014 y la Patente de Estados Unidos Núm. 6.984.720). La cadena pesada de Ipilimumab tiene un dominio variable (V_H) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 21. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen V_H CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 25); V_H CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 26); y V_H CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 27). La cadena ligera de Ipilimumab tiene un dominio variable (V_L) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 24, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 23. Las CDR de la cadena ligera incluyen, V_L CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 28); V_L CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 29); y V_L CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 30). Cuando se produce de forma recombinante, Ipilimumab se compone de cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas de 447 aminoácidos cada una y dos cadenas ligeras kappa idénticas de 215 aminoácidos cada una. Cada par de cadenas pesada y ligera está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

El anticuerpo anti-CTLA4 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también incluye fragmentos de unión a antígeno de Ipilimumab completo o variantes del mismo. Un fragmento de unión a antígeno contiene mínimamente una cadena pesada variable y/o una cadena ligera variable de ipilimumab, o una porción de la misma suficiente para formar un sitio de unión a antígeno suficiente para unirse a CTLA4. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser cualquier forma de un anticuerpo siempre que, cuando se produzca o se ensamble en un anticuerpo, contenga mínimamente una porción suficiente de la cadena pesada variable y una porción suficiente de la cadena ligera variable para unirse inmuno-específicamente a CTLA4. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CTLA4 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria incluyen fragmentos de unión a antígeno de Ipilimumab que contienen mínimamente una cadena pesada variable (V_H) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera variable (V_L) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 24, o una porción de SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24 suficiente para formar un sitio de unión a antígeno para unirse inmuno-específicamente a CTLA4. Por ejemplo, los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd'.

El anticuerpo anti-CTLA4 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también puede incluir variantes de Ipilimumab, o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluyen las variaciones. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA4 puede incluir un anticuerpo que contiene una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 24, donde el anticuerpo variante se une de forma inmuno-específica a CTLA-4. La variación puede ser un reemplazo de aminoácidos, inserción o delección de aminoácidos. En algunos casos, solamente varía la cadena pesada. En otros casos, solo varía la cadena ligera. En otros casos, tanto la cadena pesada como la ligera

varían en comparación con el anticuerpo parental Ipilimumab.

(ii) Tremelimumab y derivados del mismo.

Un anticuerpo anti-CTLA4 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir Tremelimumab (también llamado Ticilimumab, CP-675,206 u 11.2.1) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de Tremelimumab. Tremelimumab es un anticuerpo monoclonal IgG2 completamente humano que se une específicamente a CTLA4 humana (véase p. ej., el anticuerpo designado 11.2.1 de la Pub. de Patente Internacional Núm. WO 00/37504). La cadena pesada de Tremelimumab tiene un dominio variable (V_H) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 34, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 33. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen V_H CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 282); V_H CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 283); y V_H CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 284). La cadena ligera de Tremelimumab tiene un dominio variable (V_L) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 36, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 35. Las CDR de la cadena ligera incluyen, V_L CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 285); V_L CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 286); y V_L CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 287). Cuando se produce de forma recombinante, Tremelimumab se compone de cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesada y ligera está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

El anticuerpo anti-CTLA4 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también incluye fragmentos de unión a antígeno de Tremelimumab completo o variantes del mismo. Un fragmento de unión a antígeno contiene mínimamente una cadena pesada variable y/o una cadena ligera variable de Tremelimumab, o una porción del mismo suficiente para formar un sitio de unión a antígeno suficiente para unirse a CTLA4. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser cualquier forma de un anticuerpo siempre que, cuando se produzca o se ensamble en un anticuerpo, contenga mínimamente una porción suficiente de la cadena pesada variable y una porción suficiente de la cadena ligera variable para unirse inmunespecíficamente a CTLA4. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CTLA4 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria incluyen fragmentos de unión a antígeno de Tremelimumab que contienen mínimamente una cadena pesada variable (V_H) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera variable (V_L) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 36, o una porción suficiente de SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 36 para formar un sitio de unión a antígeno para unirse inmunespecíficamente a CTLA4. Por ejemplo, los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd'.

El anticuerpo anti-CTLA4 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también puede incluir variantes de Tremelimumab, o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluyen las variaciones. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA4 puede incluir un anticuerpo que contiene una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 36, donde el anticuerpo variante se une de forma inmunespecífica a CTLA-4. La variación puede ser un reemplazo de aminoácidos, inserción o delección de aminoácidos. En algunos casos, solamente varía la cadena pesada es variada. En otros casos, solamente varía la cadena ligera. En otros casos, tanto la cadena pesada como la ligera varían en comparación con el anticuerpo Tremelimumab parental.

Las variantes de Tremelimumab son conocidas en la técnica (véase p. ej., N294 en la Publicación de Patente Internacional Núm. WO 00/37504). En algunos ejemplos, el anticuerpo, purificado de fuentes no humanas, se modifica para eliminar un sitio de glicosilación, por ejemplo, para prevenir cambios en la inmunogenicidad, farmacocinética y/o las funciones efectoras resultantes de la glicosilación no humana. Por ejemplo, en algunas variantes, una asparragina puede ser reemplazada por glutamina (Q) (p. ej., N294Q) para prevenir la glicosilación.

b. Terapias anti-PD-1 y anti-PD-L1

Las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria, incluyendo composiciones y métodos y usos de los mismos, incluyen anticuerpos terapéuticos que inhiben PD-1 o PD-L1. Los inhibidores incluyen anticuerpos y proteínas de fusión, aptámeros. Se conocen inhibidores de anticuerpos, aptámeros y proteínas de fusión que se unen a PD-1 o PD-L1 e inhiben la señalización inhibidora de PD-1. Las proteínas de fusión ilustrativas (fuera del alcance de la invención) incluyen AMP-224 (también conocida como B7-DCIg), que es un receptor soluble de fusión PD-L2-Fc descrito en las Publicaciones de Patente Internacional. Núm. WO2010/027827 y WO201 1/066342.

Se han descrito varios anticuerpos, que se unen a PD-1 o PD-L1 e inhiben la actividad inhibidora de PD-1, que se han utilizado en inmunoterapia antitumoral. Los anticuerpos anti-PD-1 incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.943.743, 8.008.449, 8.779.105, 8.735.553; Publicaciones de

Estados Unidos Núm. 2005/0180969; 2007/0166281; Publicación de Patente Internacional. Núm. WO 2008/156712. Los anticuerpos anti-PD-L1 incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los descritos en las Publicaciones de Estados Unidos Núm. 2013/0034559 y 2013/0045202; Patentes de Estados Unidos Núm. 7.943.743, 8.217.149, 8.679.767 y 8.779.108; y en las Publicaciones Internacionales Núm. WO 2010/077634 y WO 2013/019906.

(i) Anticuerpos anti-PD-1

En particular, los anticuerpos anti-PD-1 incluyen Nivolumab (también llamado BMS-936558; MDX-1106; o ONO-4538), MK-3475 (también conocido como Pembrolizumab o Lambrolizumab), Pidilizumab (o CT-011) y AMP-224. Estos anticuerpos anti-PD-1 han participado en numerosos ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres, tales como el melanoma, CPCNP, RCC, tumores malignos hematológicos, linfomas, leucemias, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y mieloma múltiple.

(a) Nivolumab y derivados del mismo.

Un anticuerpo anti-PD-1 para su uso en la terapia combinada que se proporciona en la presente memoria puede incluir Nivolumab (también conocido como BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 o 5C4) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión al antígeno de Nivolumab. Nivolumab es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que se une específicamente a PD-1 humano (véase, p. ej., el anticuerpo designado 5C4 en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.008.449). La cadena pesada de Nivolumab tiene un dominio variable (V_H) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 54, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 53. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen V_H CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 57); V_H CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 58); y V_H CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 59). La cadena ligera de Nivolumab tiene un dominio variable (V_L) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 56, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 55. Las CDR de la cadena ligera incluyen, V_L CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 60); V_L CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 61); y V_L CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 62). Cuando se produce de forma recombinante, Nivolumab se compone de cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesada y ligera está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

El anticuerpo anti-PD-1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también incluye fragmentos de unión a antígeno de Nivolumab completo o variantes del mismo. Un fragmento de unión a antígeno contiene mínimamente una cadena pesada variable y/o una cadena ligera variable de Nivolumab, o una porción suficiente del mismo para formar un sitio de unión a antígeno suficiente para unirse a PD-1. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser cualquier forma de un anticuerpo siempre que, cuando se produzca o se ensamble en un anticuerpo, contenga mínimamente una porción suficiente de la cadena pesada variable y una porción suficiente de la cadena ligera variable para unirse inmunoespecíficamente a PD 1. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria incluyen fragmentos de unión a antígeno de Nivolumab que contienen mínimamente una cadena pesada variable (V_H) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 54 y una cadena ligera variable (V_L) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 56, o una porción suficiente de SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 56 para formar un sitio de unión a antígeno para unirse inmunoespecíficamente a PD-1. Por ejemplo, los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd'.

El anticuerpo anti-PD-1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también puede incluir variantes de Nivolumab, o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluyen las variaciones. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 puede incluir un anticuerpo que contiene una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada variable expuesta en SEQ ID NO: 54 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% , 98%, o 99% con la cadena ligera variable expuesta en SEQ ID NO: 56, donde el anticuerpo variante se une de forma inmunoespecífica a PD-1. La variación puede ser un reemplazo de aminoácidos, inserción o delección de aminoácidos. En algunos casos, solamente la cadena pesada varía. En otros casos, solamente varía la cadena ligera. En otros casos, tanto la cadena pesada como la ligera varían en comparación con el anticuerpo parental de Nivolumab.

(b) MK-3475 y derivados del mismo

Un anticuerpo anti-PD-1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir MK-3475 (también llamado Pembrolizumab, Lambrolizumab o h409A11) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de MK-3475. MK-3475 es un anticuerpo monoclonal IgG4k humanizado que se une específicamente a PD-1 humano (véase, p. ej., el anticuerpo designado h409A11 en la Publicación de Patente Internacional. Núm. WO 2008/156712). La cadena pesada completa de MK-3475 tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 64, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 63, y la cadena ligera completa tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 66, codificada por una

secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 65. La cadena pesada se compone de un dominio variable (V_H), con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 68, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 67). La cadena ligera está compuesta por un dominio variable (V_L) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 69 y una región constante ligera kappa humanizada. Cuando se produce de forma recombinante, MK-3475 se compone de cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas de 447 aminoácidos cada una y dos cadenas ligeras kappa idénticas de 218 aminoácidos cada una. Cada par de cadenas pesada y ligera está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

- 10 Las CDR de MK-3475 incluyen, V_H CDR 1 (SEQ ID NO: 71); V_H CDR 2 (SEQ ID NO: 72); V_H CDR 3 (SEQ ID NO: 73); V_L CDR 1 (SEQ ID NO: 74); V_L CDR 2 (SEQ ID NO: 75); y V_L CDR 3 (SEQ ID NO: 76).

15 El anticuerpo anti-PD-1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también puede incluir variantes de MK-3475. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 puede incluir un anticuerpo que contiene una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 64 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 66. La variación puede ser un reemplazo de aminoácidos, inserción o delección de aminoácidos. En algunos casos, solamente la cadena pesada varía. En otros casos, solamente varía la cadena ligera. En otros casos, tanto la cadena pesada como la ligera varían en comparación con el anticuerpo MK-3475 parental.

25 El anticuerpo anti-PD-1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también incluye fragmentos de unión a antígeno de MK-3475 completo o variantes del mismo. Un fragmento de unión a antígeno contiene mínimamente una cadena pesada variable y/o una cadena ligera variable de MK-3475, o una porción suficiente de la misma para formar un sitio de unión a antígeno suficiente para unirse a PD-1. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser cualquier forma de un anticuerpo siempre que, cuando se produzca o se ensamble en un anticuerpo, contenga mínimamente una porción suficiente de la cadena pesada variable y una porción suficiente de la cadena ligera variable para unirse inmunespecíficamente a PD 1. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria contienen mínimamente una cadena pesada variable (V_H) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 68 y una cadena ligera variable (V_L) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70, o una porción suficiente de SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 70 para formar un sitio de unión a antígeno para unirse de forma inmunespecífica a PD-1. Por ejemplo, los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd'.

(c) Pidilizumab y derivados del mismo

40 Un anticuerpo anti-PD-1 para su uso en la terapia combinada provista en la presente memoria puede incluir Pidilizumab (también llamado hBAT-1 o CT-011) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de Pidilizumab. Pidilizumab es un anticuerpo monoclonal IgG1k humanizado que se generó a partir de un anticuerpo murino (BAT), que se originó contra las membranas de las células B linfoides, y se ha demostrado que provoca actividades basadas en las células T y en las células NK. Pidilizumab se une al PD-1 humano (véase, p. ej., el anticuerpo designado BAT-1 R_{KD}/R_{Hc} en el Documento US 2005/0180969). La cadena pesada completa de Pidilizumab tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 78, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 77, y la cadena ligera completa tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 79. La cadena pesada está compuesta por un dominio variable (V_H), con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 82, codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 81. La cadena ligera se compone de un dominio variable (V_L), con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 84, codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEQ ID NO: 83, y una región constante ligera kappa humanizada. Cuando se produce de forma recombinante, Pidilizumab se compone de cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesada y ligera está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

60 Las CDR de Pidilizumab incluyen, V_H CDR 1 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 85); V_H CDR 2 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 86); V_H CDR 3 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 87); V_L CDR 1 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 88); V_L CDR 2 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 89); y V_L CDR 3 (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 90).

El anticuerpo anti-PD-1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también puede incluir variantes de Pidilizumab. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 puede incluir un anticuerpo que contiene una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%,

88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 78 y una cadena ligera que tiene una secuencia de amino ácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 80. La variación puede ser un reemplazo de aminoácidos, inserción o delección de aminoácidos. En algunos casos, solamente varía la cadena pesada. En otros casos, solamente varía la cadena ligera. En otros casos, tanto la cadena pesada como la ligera varían en comparación con el anticuerpo parental de Pidilizumab.

El anticuerpo anti-PD-1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también incluye fragmentos de unión a antígeno de Pidilizumab completo o variantes del mismo. Un fragmento de unión a antígeno contiene mínimamente una cadena pesada variable y/o una cadena ligera variable de Pidilizumab, o una porción suficiente del mismo para formar un sitio de unión a antígeno suficiente para unirse a PD-1. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser cualquier forma de un anticuerpo siempre que, cuando se produzca o se ensamble en un anticuerpo, contenga mínimamente una porción suficiente de la cadena pesada variable y una porción suficiente de la cadena ligera variable para unirse inmuno-específicamente a PD-1. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria contienen mínimamente una cadena pesada variable (V_H) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 82 y una cadena ligera variable (V_L) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 84, o una porción suficiente de SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 84 para formar un sitio de unión a antígeno para unirse inmuno-específicamente a PD-1. Por ejemplo, los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd'.

(ii). Anticuerpos anti-PD-L1

En particular, los anticuerpos anti-PD-L1 (o anti-B7H1) incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos llamados BMS-936559 (o MDX-1105), MPDL3280A (o RG7446) y MED14736. Estos anticuerpos anti-PD-L1 han participado en numerosos ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres, tales como el melanoma, CPCNP, cáncer de ovario, RCC y cáncer de pulmón.

(a) BMS-936559 y derivados del mismo

Un anticuerpo anti-PD-L1 para uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir BMS-936559 (también conocido como MDX-1105 o 12A4) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de BMS-936559. BMS-936559 es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que se une específicamente a PD-L1 humano (véase, *p. ej.*, el anticuerpo designado 12A4 en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.943.743). La cadena pesada de BMS-936559 tiene un dominio variable (V_H) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 92, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 91. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen V_H CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 95); V_H CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 96); y V_H CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 97). La cadena ligera de BMS-936559 tiene un dominio variable (V_L) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 94, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 93. Las CDR de la cadena ligera incluyen, V_L CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 98); V_L CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 99); y V_L CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 100). Cuando se produce de forma recombinante, BMS-936559 se compone de cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesada y ligera está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

El anticuerpo anti-PD-L1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también incluye fragmentos de unión a antígeno de BMS-936559 completo o variantes del mismo. Un fragmento de unión a antígeno contiene mínimamente una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable de BMS-936559, o una porción suficiente de la misma para formar un sitio de unión a antígeno suficiente para unirse a PD-L1. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser cualquier forma de un anticuerpo siempre que, cuando se produzca o se ensamble en un anticuerpo, contenga mínimamente una porción suficiente de la cadena pesada variable y una porción suficiente de la cadena ligera variable para unirse inmuno-específicamente a PD L1. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-L1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria incluyen fragmentos de unión a antígeno de BMS-936559 que contienen mínimamente una cadena pesada variable (V_H) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 92 y una cadena ligera variable (V_L) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 94, o una porción suficiente de SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 94 para formar un sitio de unión a antígeno para unirse inmuno-específicamente a PD-L1. Por ejemplo, los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd'.

El anticuerpo anti-PD-L1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también puede incluir variantes de BMS-936559, o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluyen las variaciones. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 puede incluir un anticuerpo que contiene una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada variable expuesta en SEQ ID NO: 92 y

una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera variable expuesta en SEQ ID NO: 94, donde el anticuerpo variante se une de forma inmuno-específica a PD-L1. La variación puede ser un reemplazo de aminoácidos, inserción o delección de aminoácidos. En algunos casos, solamente varía la cadena pesada. En otros casos, solamente varía la cadena ligera. En otros casos, tanto la cadena pesada como la ligera varían en comparación con el anticuerpo BMS-936559 parental.

(b) MPDL3280A y derivados del mismo.

Un anticuerpo anti-PD-L1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir MPDL3280A (también conocido como RG7446) o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de MPDL3280A. MPDL3280A es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que se une específicamente a PD-L1 humano (véase, *p. ej.*, la Patente de Estados Unidos Núm. 8.217.149 y la Publicación de Patente Internacional Núm. WO 2013/019906). MPDL3280A contiene un dominio variable de cadena pesada (V_H) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 114 y un dominio variable de cadena ligera (V_L) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 115. El anticuerpo completo contiene una secuencia de cadena pesada de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 318 o 320 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 319. También se informa de que el anticuerpo completo contiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 112 y una secuencia de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 113 (véase la Publicación de Patente Internacional Núm. WO 2013019906). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen V_H CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 116); V_H CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 117); y V_H CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 118). Los CDR de la cadena ligera incluyen, V_L CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 119); V_L CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 120); y V_L CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 121). Cuando se produce de forma recombinante, MPDL3280A está formado por cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesada y ligera está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

El anticuerpo anti-PD-L1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también puede incluir variantes de MPDL3280A, o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluyen las variaciones. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 puede incluir un anticuerpo que contiene una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 112, 318 o 320 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 113 o 319, donde el anticuerpo variante se une de forma inmuno-específica a PD-L1. La variación puede ser un reemplazo de aminoácidos, inserción o delección de aminoácidos. En algunos casos, solamente varía la cadena pesada. En otros casos, solamente varía la cadena ligera. En otros casos, tanto la cadena pesada como la ligera varían en comparación con el anticuerpo parental MPDL3280A.

El anticuerpo anti-PD-L1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también incluye fragmentos de unión a antígeno de MPDL3280A completo o variantes del mismo. Un fragmento de unión a antígeno contiene mínimamente una cadena pesada variable y/o una cadena ligera variable de MPDL3280A, o una porción suficiente de la misma para formar un sitio de unión a antígeno suficiente para unirse a PD-L1. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser cualquier forma de un anticuerpo siempre que, cuando se produzca o se ensamble en un anticuerpo, contenga mínimamente una porción suficiente de la cadena pesada variable y una porción suficiente de la cadena ligera variable para unirse inmuno-específicamente a PD L1. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-L1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria incluyen fragmentos de unión a antígeno de MPDL3280A que contienen mínimamente una cadena pesada variable (V_H) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 114 y una cadena ligera variable (V_L) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 115, o una porción suficiente de SEQ ID NO: 114 y SEQ ID NO: 115 para formar un sitio de unión a antígeno para unirse inmuno-específicamente a PD-L1. Por ejemplo, los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd'.

(c) MEDI4736 y derivados del mismo

Un anticuerpo anti-PD-L1 para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede incluir MEDI4736 o derivados del mismo, tales como variantes o fragmentos de unión a antígeno de MEDI4736. MEDI4736 es un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humano que se une específicamente a PD-L1 humano (véase, *p. ej.*, el anticuerpo designado 2.7A4OPT en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2013/0034559). La cadena pesada de MEDI4736 tiene un dominio variable (V_H) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 102, codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 101. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada incluyen V_H CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 105); V_H CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 106); y V_H CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 107). La cadena ligera de MEDI4736 tiene un dominio variable (V_L) con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 104, codificada por la secuencia de

nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 103. Las CDR de la cadena ligera incluyen, V_L CDR 1 (expuesta en SEQ ID NO: 108); V_L CDR 2 (expuesta en SEQ ID NO: 109); y V_L CDR 3 (expuesta en SEQ ID NO: 110). Cuando se produce de forma recombinante, MEDI4736 se compone de cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras kappa idénticas. Cada par de cadenas pesada y ligera está unido a través de un enlace disulfuro entre cadenas.

El anticuerpo anti-PD-L1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también incluye fragmentos de unión a antígeno de MEDI4736 completo o variantes de los mismos. Un fragmento de unión a antígeno contiene mínimamente una cadena pesada variable y/o una cadena ligera variable de MEDI4736, o una porción suficiente de la misma para formar un sitio de unión a antígeno suficiente para unirse a PD-L1. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser cualquier forma de un anticuerpo siempre que, cuando se produzca o se ensamble en un anticuerpo, contenga mínimamente una porción suficiente de la cadena pesada variable y una porción suficiente de la cadena ligera variable para unirse inmunoespecíficamente a PD L1. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-LI para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria incluyen fragmentos de unión a antígeno de MEDI4736 que contienen mínimamente una cadena pesada variable (V_H) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 102 y una cadena ligera variable (V_L) con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 104, o una porción suficiente de SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 104 para formar un sitio de unión a antígeno para unirse inmunoespecíficamente a PD-L1. Por ejemplo, los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, dsFv, diacuerpo, Fd y Fd'.

El anticuerpo anti-PD-L1 en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria también puede incluir variantes de MEDI473 6, o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluyen las variaciones. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-LI puede incluir un anticuerpo que contiene una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada variable expuesta en SEQ ID NO: 102 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la cadena ligera variable expuesta en SEQ ID NO: 104, donde el anticuerpo variante se une de forma inmunoespecífica a PD-L1. La variación puede ser un reemplazo de aminoácidos, inserción o delección de aminoácidos. En algunos casos, solamente varía la cadena pesada. En otros casos, solamente varía la cadena ligera. En otros casos, tanto la cadena pesada como la ligera varían en comparación con el anticuerpo parental MEDI4736.

c. Otras terapias inmunomoduladoras

Otros agentes inmunomoduladores que se contemplan para su uso en las combinaciones, métodos y usos proporcionados en la presente memoria incluyen agentes inhibidores dirigidos contra los receptores inhibidores, el gen 3 de activación de linfocitos (LAG3) y la proteína 3 de membrana de células T (TIM3), ligandos inhibidores tales como PD-L2 (o B7-H2), B7-H3, B7-H4 y CD25, y la enzima inmunosupresora Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Los agentes dirigidos contra LAG3 (p. ej., la proteína de fusión IMP321 y múltiples mAb) y anticuerpos anti B7-H3 (p. ej., MGA271) se han caracterizado y están en uso en ensayos clínicos. Los anticuerpos o agentes inhibidores de B7-H4 y TIM3 están en desarrollo preclínico (Pardoll, Nat Rev Cáncer. 22 de Marzo de 2012; 12(4):252-264). Se pueden incluir uno o más cualesquiera de estos agentes en cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria.

Además de los anticuerpos inhibidores que se dirigen a, e inhiben las proteínas de puntos de control inmunitario, se contemplan los anticuerpos agonistas, que son capaces de estimular una respuesta inmunitaria uniéndose a su proteína/receptor diana, para su uso en las combinaciones, métodos y usos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, Urelumab (también conocido como BMS-663513 y anti-4-1BB) es un anticuerpo monoclonal humanizado agonista que se dirige al co-receptor CD137, que es un miembro de la familia de receptores factor de necrosis tumoral (TNF)/factor de crecimiento nervioso (NGF) y se expresa sobre células dendríticas, células dendríticas foliculares, células asesinas naturales, granulocitos y células de las paredes de los vasos sanguíneos en sitios de inflamación, con propiedades inmunoestimuladoras. Urelumab se une a, y activa específicamente las células inmunitarias que expresan CD137, estimulando una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta de células T citotóxicas, que puede montarse contra las células tumorales cuando se administra como parte de una terapia combinada proporcionada en la presente memoria (véase, p. ej., Vinay et al., (2012) Mol Cancer Ther. 11(5):1062-1070). También se pueden incluir otros agonistas de 4-1BB en las combinaciones proporcionadas en la presente memoria, tales como las descritas por Snell et al. En Immunol Rev. 244:197-217 (2011). OX40 (también conocido como CD134) es otro receptor inmunoestimulador, de la familia de TNF, que puede ser elegido como diana incorporando agonistas de OX40, tales como los descritos por Weinberg et al. En Immunol Rev. 244 (1): 218-231 (2011), en las combinaciones proporcionadas en la presente memoria. También se han descrito los ligandos de aptámeros que se unen a, y estimulan la señalización de 4-1BB o OX40 (Gilboa et al., Clin Cancer Res. 19(5):1054-1062) y se contemplan para su inclusión en las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria.

2. Enzimas de degradación de hialuronano y Enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímero

La terapia combinada, que incluye combinaciones y combinaciones para su uso, proporcionada en la presente memoria contiene una enzima de degradación de hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero. La enzima de degradación de hialuronano es una que se puede administrar de manera que alcance su diana y, en particular, alcance una célula tumoral que contenga HA pericelular elevado. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano se puede administrar por infusión continua o se puede inyectar localmente, se puede modificar con un polímero, o es una que está aglicosilada o está modificada de tal manera que está aglicosilada o tenga una glicosilación reducida. En un ejemplo, las composiciones y combinaciones proporcionadas contienen una enzima de degradación de hialuronano, en particular una hialuronidasa, tal como una hialuronidasa soluble (p. ej., una PH20 o PH20 truncada), que se ha modificado por conjugación con una o más moléculas poliméricas (polímero), por lo general para aumentar la semi-vida de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo, para promover efectos de tratamiento prolongado/sostenido en un sujeto.

El hialuronano es un componente de la matriz extracelular y un constituyente importante de la barrera intersticial. Al catalizar la hidrólisis del hialuronano, las enzimas que degradan el hialuronano disminuyen la viscosidad del hialuronano, lo que aumenta la permeabilidad del tejido y aumenta la velocidad de absorción de los líquidos administrados por vía parenteral. Las enzimas de degradación de hialuronano, tales como la hialuronidasa, interfieren en, y degradan el ácido hialurónico (HA). El tratamiento con enzimas de degradación de hialuronano reduce el hialuronano de modo que el tejido se desinfla, los vasos sanguíneos se expanden y más sangre puede fluir a través del sitio. Como tales, las enzimas de degradación de hialuronano, tales como las hialuronidasas, se han utilizado, por ejemplo, como agentes de propagación o dispersión junto con otros agentes, fármacos y proteínas para mejorar su dispersión y administración.

Las enzimas de degradación de hialuronano actúan para degradar el hialuronano al dividir los polímeros de hialuronano, que se componen de unidades de disacáridos que se repiten, ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidos entre sí por medio de enlaces glicosídicos β -1 $\rightarrow$ 4 y β -1 $\rightarrow$ 3. Las cadenas de hialuronano pueden alcanzar aproximadamente 25,000 repeticiones de disacáridos o más de longitud y los polímeros de hialuronano pueden alcanzar un tamaño que varía desde aproximadamente 5.000 hasta 20.000,000 Da *in vivo*. Al catalizar la hidrólisis del hialuronano, un constituyente principal de la barrera intersticial, las enzimas que degradan el hialuronano reducen la viscosidad del hialuronano, lo que aumenta la permeabilidad del tejido.

Por consiguiente, las enzimas de degradación de hialuronano incluyen cualquier enzima que tenga la capacidad de catalizar la escisión de una cadena o polímero de disacáridos de hialuronano. En algunos ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano rompe el enlace glicosídico β -1 $\rightarrow$ 4 en la cadena o polímero de hialuronano. En otros ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano cataliza la escisión del enlace glicosídico β -1 $\rightarrow$ 3 en la cadena o polímero de hialuronano.

Las enzimas de degradación de hialuronano incluyen las hialuronidasas, así como otras enzimas tales como las condroitinasas y las liasas que tienen la capacidad de escindir el hialuronano. Adicionalmente, las enzimas que degradan el hialuronano también incluyen formas solubles de las mismas que se pueden expresar y secretar de las células. Como se describe a continuación, las enzimas de degradación de hialuronano existen en formas unidas a la membrana o solubles que se secretan de las células. Para los fines de la presente memoria, se proporcionan enzimas de degradación de hialuronano solubles para su uso en las combinaciones y combinaciones para su uso en la presente memoria. Por lo tanto, cuando las enzimas de degradación de hialuronano incluyen un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y/o están anclados a la membrana de otra manera o son insolubles, tales enzimas de degradación de hialuronano se pueden proporcionar en forma soluble por truncamiento o delección de toda o una parte del ancla de GPI para convertir la enzima en secretada y soluble. Por lo tanto, las enzimas de degradación de hialuronano incluyen variantes truncadas, p. ej., truncadas para eliminar toda o una parte del ancla de GPI. Los ejemplos de tales hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas PH20 solubles, tales como las que se exponen en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.767.429; las Publicaciones de Estados Unidos Núm. US20040268425 o US20100143457. Véanse también las hialuronidasas PH20 humanas solubles ilustrativas expuestas en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158).

Las enzimas de degradación de hialuronano también incluyen variantes de cualquier enzima de degradación de hialuronano, tales como cualquier hialuronidasa o hialuronidasa soluble, por ejemplo una PH20, que sea conocida por un experto en la técnica o se describa en la presente memoria. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano pueden contener una o más variaciones en su secuencia primaria, tales como sustituciones, adiciones y/o delecciones de aminoácidos. Una variante de una enzima de degradación de hialuronano generalmente muestra al menos 60%, 70%, 80%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia en comparación con la enzima de degradación de hialuronano que no contiene la variación. Se puede incluir cualquier variación en la enzima de degradación de hialuronano para los fines de la presente memoria siempre que la enzima conserve la actividad hialuronidasa, tal como al menos o aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de la actividad de una enzima de degradación de hialuronano que no contiene la variación (según lo medido mediante ensayos *in vitro* y/o *in vivo* bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria). Por ejemplo, las enzimas de degradación de

hialuronano ilustrativas, incluyendo las que se pueden conjugar con un polímero, son aquellas que muestran al menos o aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 122-170. Como se explica a continuación, se conocen ejemplos de tales variantes de PH20 y se describen en la Publicación de Estados Unidos Núm. US2013-0302275.

Se han preparado y aprobado varias formas de enzimas de degradación de hialuronano, incluidas las hialuronidasas, para su uso terapéutico en sujetos, incluyendo los seres humanos. Por ejemplo, las preparaciones de hialuronidasas derivadas de animales incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada, Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular bovina e Hydase™ (Prima Pharm Inc.), una hialuronidasa testicular bovina. Hylenex® (Halozyme Therapeutics) es una hialuronidasa recombinante humana producida por células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas por ingeniería genética que contienen ácido nucleico que codifica formas solubles de PH20, designada rHuPH20 (véase p. ej., la Publicación de Estados Unidos Núm. US20040268425; la Patente de Estados Unidos Núm. 7.767.429). Se entiende que cualquier preparación de hialuronidasa se puede utilizar en las combinaciones y combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria (véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 2.488.564, 2.488.565, 2.676.139, 2.795.529, 2.806.815, 2.808.362, 5.747.027 y 5.827.721 y la Publicación Internacional PCT Núm. WO2005/118799; la Publicación de Estados Unidos Núm. US20040268425; la Patente de Estados Unidos Núm. 7.767.429; o cualquiera de las proporcionadas en la presente memoria).

A continuación se presenta una descripción no limitante de las enzimas de degradación de hialuronano ilustrativas, tales como enzimas hialuronidasas o enzimas hialuronidasas solubles, por ejemplo, PH20, para su uso en las combinaciones proporcionadas en la presente memoria. En general, tales enzimas de degradación de hialuronano incluyen aquellas que están conjugadas con un polímero.

a. Hialuronidasas

Las hialuronidasas son miembros de una gran familia de enzimas de degradación de hialuronano. Hay tres clases generales de hialuronidasas: hialuronidasas de tipo mamífero, hialuronidasas bacterianas y hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Se conocen otras hialuronidasas, tales como la de avispa chaqueta amarilla (SEQ ID NO: 171 y 172), la de abeja (SEQ ID NO: 173), la de avispa de cara blanca (SEQ ID NO: 174) y la de avispa papelera (SEQ ID NO: 175). Cualquiera de tales enzimas se puede utilizar en las composiciones, combinaciones y combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria.

i. Hialuronidasas de tipo mamífero

Las hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35) son *endo-β-N-acetil*-hexosaminidasas que hidrolizan el enlace glicosídico β-1→4 del hialuronano en diversas longitudes de oligosacáridos, como tetrasacáridos y hexasacáridos. Estas enzimas tienen actividades tanto hidrolíticas como de transglicosidasa, y pueden degradar el hialuronano y los sulfatos de condroitina (CS), generalmente C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, de las de vaca (bovinas) (SEQ ID NO: 163, 164 y 176-178, y moléculas de ácido nucleico expuestas en SEQ ID NO: 181-183), de oveja (*Ovis Aries*) (SEQ ID NO: 184-187, moléculas de ácido nucleico expuestas en SEQ ID NO: 188-190), de cerdo (SEQ ID NO: 191-192), de ratón (SEQ ID NO: 165, 193-196), de rata (SEQ ID NO: 166, 198-201), de conejo (SEQ ID NO: 167, 203), de orangután (SEQ ID NO: 205), de mono cinomolgo (SEQ ID NO: 162, 206), de cobaya (SEQ ID NO: 168, 197), de chimpancé (SEQ ID NO: 159, 160 y 204), de mono Rhesus (SEQ ID NO: 161, 202), de zorro (SEQ ID NO: 169, 170) y las hialuronidasas humanas (SEQ ID NOS: 122, 217-221). Las hialuronidasas anteriores incluyen hialuronidasas PH20. Además, la hialuronidasa BH55 es de este tipo como se describe en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.747.027 y 5.827.721. Las hialuronidasas ilustrativas en las composiciones, combinaciones y combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria son hialuronidasas solubles.

Las hialuronidasas de mamífero se pueden subdividir en aquellas que son activas en condiciones neutras, predominantemente encontradas en extractos de testículos, y activas en condiciones ácidas, predominantemente en órganos tales como el hígado. Las hialuronidasas activas en condiciones neutras ilustrativas incluyen PH20, que incluye, pero no se limita a, PH20 derivada de diferentes especies, tales como ovina (SEQ ID NO: 185-187), bovina (SEQ ID NO: 177, 178) y humana (SEQ ID NO: 217). La PH20 humana (también conocida como SPAM1 o proteína de la superficie del espermatozoide PH20), generalmente se ancla a la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidil inositol (GPI). Éste está naturalmente involucrado en la adhesión de espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración por el espermatozoide de la capa de células del cúmulo mediante la digestión del ácido hialurónico.

Además de la PH20 humana (o SPAM1), se han identificado cinco genes similares a la hialuronidasa en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y HYALP1. HYALP1 es un pseudogén, y no se ha demostrado que HYAL3 (SEQ ID NO: 220) posea actividad enzimática hacia ningún sustrato conocido. HYAL4 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 221) es una condroitinasa y presenta poca actividad hacia el hialuronano. HYAL1

(polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 218) es el enzima activo en condiciones ácidas prototípica y PH20 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 217) es la enzima activa en condiciones neutras prototípica. Las hialuronidasas activas en condiciones ácidas, tales como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 219) generalmente carecen de actividad catalítica a pH neutro (es decir, pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* por encima de pH 4,5 (Frost et al. (1997) Anal. Biochem. 251: 263-269). HYAL2 es una enzima activa en condiciones ácida con una actividad específica muy baja *in vitro*. Las enzimas similares a la hialuronidasa también se pueden caracterizar por aquellas que generalmente se anclan a la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidil inositol (GPI) como la HYAL2 humana y la PH20 humana (Danilkevitch-Miagkova et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100(8):4580-4585), y aquellas que son generalmente solubles tales como HYAL1 humana (Frost et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1):10-15).

PH20

PH20, al igual que otras hialuronidasas de mamífero, es una endo- β -N-acetil-hexosaminidasa que hidroliza el enlace glicosídico $\beta 1 \rightarrow 4$ del ácido hialurónico en varias longitudes de oligosacáridos, tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Tiene actividades tanto hidrolíticas como de transglicosidasa y puede degradar el ácido hialurónico y los sulfatos de condroitina, tales como el C4-S y el C6-S. PH20 participa naturalmente en la adherencia espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración por el espermatozoide de la capa de células del cúmulo mediante la digestión del ácido hialurónico. La PH20 se encuentra localizada sobre la superficie del espermatozoide y en el acrosoma derivado del lisosoma, donde se une a la membrana acrosómica interna. La PH20 de la membrana plasmática tiene actividad hialuronidasa solamente a pH neutro, mientras que la PH20 de la membrana acrosómica interna tiene actividad tanto a pH neutro como ácido. Además de ser una hialuronidasa, la PH20 también parece ser un receptor para la señalización celular inducida por HA, y un receptor para la zona pelúcida que rodea al ovocito.

Las proteínas PH20 ilustrativas, incluidas las formas precursoras y maduras, incluyen, pero no se limitan a, polipéptido humano (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 217, polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 122), polipéptidos PH20 de chimpancé (SEQ ID NO: 159, 160 y 204), de mono Rhesus (SEQ ID NO: 161, 202) bovino (SEQ ID NO: 164, 163, 177, 178), de conejo (SEQ ID NO: 167, 203), PH20 ovino (SEQ ID NO: 185 -187), de mono *Cynomolgus* (SEQ ID NO: 162, 206), de cobaya (SEQ ID NO: 168, 197), de rata (SEQ ID NO: 166, 201), de ratón (SEQ ID NO: 165, 196) y de zorro (SEQ ID NO: 169, 170).

La PH20 bovino es un polipéptido precursor de 553 aminoácidos (SEQ ID NO: 177). El alineamiento de la PH20 bovina con la PH20 humana solamente muestra una homología débil, con múltiples huecos existentes desde el aminoácido 470 hasta los respectivos extremos carboxi debido a la ausencia de un ancla de GPI en el polipéptido bovino (véase *p. ej.*, Frost (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4:427-440). De hecho, las anclas de GPI claras no se pronostican en muchas otras especies de PH20 además de los seres humanos. Por lo tanto, los polipéptidos PH20 producidos a partir de óvidos y bóvidos existen naturalmente como formas solubles. Aunque la PH20 bovina se encuentra muy poco adherida a la membrana plasmática, no está anclada a través de un ancla sensible a la fosfolipasa (Lalancette et al. (2001) Biol Reprod. 65(2):628-636). Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa de testículo bovino como un extracto para uso clínico (Wydase®, Hyalase®).

El transcrito del ARNm de PH20 humana se traduce normalmente para generar un polipéptido precursor de 509 aminoácidos (SEQ ID NO: 217) que contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en el extremo N (posiciones de residuos de aminoácidos 1-35) y una secuencia señal de anclaje al ancla de glicosilfosfatidilinositol de 19 aminoácidos (GPI) en el extremo C (posiciones de residuos de aminoácidos 491-509). La PH20 madura, por lo tanto, es un polipéptido de 474 aminoácidos expuesto en SEQ ID NO: 122. Después del transporte del polipéptido precursor al RE y la eliminación del péptido señal, el péptido señal de anclaje a GPI C-terminal se escinde para facilitar el anclaje covalente de un ancla de GPI al aminoácido C-terminal recién formado en la posición del aminoácido correspondiente a la posición 490 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 217. Así, se produce un polipéptido maduro anclado a GPI de 474 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos, expuesta en SEQ ID NO: 122.

La PH20 humano muestra actividad hialuronidasa a pH neutro y ácido. En un aspecto, la PH20 humana es la hialuronidasa activa en condiciones neutras prototípica que generalmente se fija a la membrana plasmática a través de un ancla de GPI. En otro aspecto, la PH20 se expresa sobre la membrana acrosómica interna donde tiene actividad hialuronidasa a pH neutro y ácido. Parece que PH20 contiene dos sitios catalíticos en distintas regiones del polipéptido: las regiones Péptido 1 y Péptido 3 (Cherr et al., (2001) Matrix Biology 20:515-525). La evidencia indica que la región del Péptido 1 de PH20, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 107-137 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 122 y las posiciones 142-172 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 217, es necesaria para la actividad enzimática a pH neutro. Los aminoácidos en las posiciones 111 y 113 (correspondientes al polipéptido PH20 maduro expuesto en SEQ ID NO: 122) dentro de esta región parecen ser importantes para la actividad, ya que la mutagénesis por reemplazo de aminoácidos produce como resultado polipéptidos de PH20 con un 3% de actividad hialuronidasa o con actividad hialuronidasa no detectable,

respectivamente, en comparación con la PH20 de tipo salvaje (Arming et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814).

La región del Péptido 3, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 242-262 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 122, y las posiciones 277-297 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 217, parece ser importante para la actividad enzimática a pH ácido. Dentro de esta región, los aminoácidos en las posiciones 249 y 252 del polipéptido de PH20 maduro parecen ser esenciales para la actividad, y la mutagénesis de uno de los dos produce como resultado un polipéptido esencialmente desprovisto de actividad (Arming et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814).

Además de los sitios catalíticos, la PH20 también contiene un sitio de unión a hialuronano. La evidencia experimental indica que este sitio está ubicado en la región del Péptido 2, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 205-235 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 217 y las posiciones 170-200 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 122. Esta región está altamente conservada entre las hialuronidasas y es similar al motivo de unión a la heparina. La mutación del residuo de arginina en la posición 176 (correspondiente al polipéptido de PH20 maduro expuesto en SEQ ID NO: 122) a un a glicina da como resultado un polipéptido con solo aproximadamente 1% de la actividad hialuronidasa del polipéptido de tipo salvaje (Arming et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814).

Hay siete sitios potenciales de glicosilación, incluidos los sitios de glicosilación unidos a N y O, en PH20 humana en N82, N166, N235, N254, N368, N393 y S490 del polipéptido ilustrado en SEQ ID NO: 217. Debido a que los aminoácidos 36 a 464 de SEQ ID NO: 217 parecen contener el dominio de hialuronidasa PH20 humano mínimamente activo, el sitio de glicosilación en S490 no es necesario para la actividad una hialuronidasa adecuada. Hay seis enlaces disulfuro en la PH20 humana. Dos enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 del polipéptido ilustrado en SEQ ID NO: 217 (correspondiente a los residuos C25 y C316, y C189 y C203 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 122 respectivamente). Se forman cuatro enlaces disulfuro adicionales entre los residuos de cisteína C376 y C387; entre C381 y C435; entre C437 y C443; y entre C458 y C464 del polipéptido ilustrado en SEQ ID NO: 217 (correspondiente a los residuos C341 y C352; entre C346 y C400; entre C402 y C408; y entre C423 y C429 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 122, respectivamente).

ii. Hialuronidasa bacteriana

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

Las hialuronidasas ilustrativas de bacterias para su uso en las composiciones, combinaciones y combinaciones para su uso proporcionadas incluyen, pero no se limitan a, enzimas de degradación de hialuronano en microorganismos, incluyendo cepas de *Arthrobacter*, *Bdellovibrio*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, y *Streptomyces*. Los ejemplos particulares de tales cepas y enzimas incluyen, pero no se limitan a *Arthrobacter* sp. (cepa FB24) (SEQ ID NO: 222), *Bdellovibrio bacteriovorus* (SEQ ID NO: 223), *Propionibacterium acnes* (SEQ ID NO: 224), *Streptococcus agalactiae* ((SEQ ID NO: 225); 18RS21 (SEQ ID NO: 226); serotipo Ia (SEQ ID NO: 227); y serotipo III (SEQ ID NO: 228)), *Staphylococcus aureus* (cepa COL (SEQ ID NO: 229); cepa MRSA252 (SEQ ID NO: 230, 231); cepa MSSA476 (SEQ ID NO: 232); cepa NCTC 8325 (SEQ ID NO: 233); cepa bovina RF122 (SEQ ID NO: 234, 235) y cepa USA300 (SEQ ID NO: 236)), *Streptococcus pneumoniae* ((SEQ ID NO: 237); cepa ATCC BAA-255/R6 (SEQ ID NO: 238) y serotipo 2, cepa D39/NCTC 7466 (SEQ ID NO: 239)), *Streptococcus pyogenes* (serotipo M1 (SEQ ID NO: 240); serotipo M2, cepa MGAS10270 (SEQ ID NO: 241); serotipo M4, cepa MGAS10750 (SEQ ID NO: 242); serotipo M6 (SEQ ID NO: 243); serotipo M12, cepa MGAS2096 (SEQ ID NO: 244, 245); serotipo M12, cepa MGAS9429 (SEQ ID NO: 246) y serotipo M28 (SEQ ID NO: 247)); *Streptococcus suis* (SEQ ID NO: 248-250); *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601/ES114 (SEQ ID NO: 251)), y la enzima hialuronidasa de *Streptomyces hyaluronolyticus*, que es específica para el ácido hialurónico y no escinde la condroitina ni el sulfato de condroitina (Ohya, T. y Kaneko, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198:607).

iii. Hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos.

Las hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36) son endo- β -glucuronidasas que generan productos finales de tetra- y hexasacáridos. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces $1 \rightarrow 3$ entre los residuos de β -D-glucuronato y N-acetil-D-glucosamina en hialuronato. Las hialuronidasas ilustrativas de sanguijuelas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas de Hirudinidae (p. ej., *Hirudo medicinalis*), Erpobdellidae (p. ej., *Nepheleopsis obscura* y *Erpobdella punctata*), Glossiphoniidae (p. ej., *Desserobdella picta*, *Helobdella stagnalis*, *Glossiphonia complanata*, *Placobdella ornata* y *Theromyzon* sp.) y Haemopidae (*Haemopsis marmorata*).

(Hovingh et al. (1999) Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 124 (3):319-26). Una hialuronidasa ilustrativa de una bacteria que tiene el mismo mecanismo de acción que la hialuronidasa de la sanguijuela es la de la cianobacteria, *Synechococcus sp.*; cepa RCC307 (SEQ ID NO: 252).

5 b. Otras enzimas de degradación de hialuronano

Además de la familia de las hialuronidasas, en la presente memoria se describen otras enzimas de degradación de hialuronano. Por ejemplo, se pueden emplear enzimas, incluidas condroitinasas y liasas particulares, que tienen la capacidad de escindir hialuronano. Las condroitinasas ilustrativas que pueden degradar el hialuronano incluyen, pero no se limitan a, condroitina ABC liasa (también conocida como condroitinasa ABC), condroitina AC liasa (también conocida como condroitina sulfato liasa o condroitina sulfato eliminasa) y condroitina C liasa. Los métodos para la producción y purificación de tales enzimas para su uso en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados son conocidos en la técnica (p. ej., Patente de Estados Unidos Núm. 6.054.569; Yamagata, et al. (1968) J. Biol. Chem. 243 (7): 1523-1535; Yang et al. (1985) J. Biol. Chem. 160 (30): 1849-1857).

La condroitina ABC liasa contiene dos enzimas, condroitin-sulfato-ABC endoliasa (EC 4.2.2.20) y condroitin-sulfato-ABC exoliasa (EC 4.2.2.21) (Hamaï et al. (1997) J Biol Chem. 272 (14):9123-30), que degradan una variedad de glicosaminoglicanos de tipo sulfato de condroitina y sulfato de dermatán. El sulfato de condroitina, el proteoglicano sulfato de condroitina y el sulfato de dermatán son los sustratos preferidos para la sulfato de condroitina-ABC endoliasa, pero la enzima también puede actuar sobre el hialuronano a una tasa menor. La sulfato de condroitina-ABC endoliasa degrada una variedad de glicosaminoglicanos de tipo sulfato de condroitina y sulfato de dermatán, produciendo una mezcla de oligosacáridos $\Delta 4$ -insaturados de diferentes tamaños que finalmente se degradan a tetra- y disacáridos $\Delta 4$ insaturados. El sulfato de condroitina-ABC exoliasa tiene la misma especificidad de sustrato, pero elimina los residuos de disacáridos de los extremos no reductores de ambos sulfatos de condroitina poliméricos y sus fragmentos oligosacáridos producidos por la sulfato de condroitina-ABC endoliasa (Hamaï, A. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:9123-9130). Las sulfato de condroitina-ABC endoliasas de y las sulfato de condroitina-ABC exoliasas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, las de *Proteus vulgaris* y *Flavobacterium heparinum* (la sulfato de condroitina-ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se expone en SEQ ID NO: 253 (Sato et al. (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1):39-46).

La condroitina AC liasa (EC 4.2.2.5) es activa sobre los sulfatos de condroitina A y C, la condroitina y el ácido hialurónico, pero no es activa sobre el sulfato de dermatán (sulfato de condroitina B). Las enzimas condroitinasa AC ilustrativas de bacterias incluyen, pero no se limitan a, aquellas de *Flavobacterium heparinum* y *Victivallis vadensis*, expuestas en SEQ ID NOS: 254 y 255, respectivamente, y *Arthrobacter aureus* (Tkalec et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1):29-35; Ernst et al. (1995) Critical Reviewal in Biochemistry and Molecular Biology 30(5):387-444).

La condroitinasa C escinde el sulfato de condroitina C, que produce tetrasacáridos más un disacárido 6-sulfatado insaturado (delta Di-6S). También escinde el ácido hialurónico produciendo disacáridos no sulfatados insaturados (delta Di-OS). Las enzimas condroitinasa C ilustrativas de bacterias incluyen, pero no se limitan a, aquellas de *Streptococcus* y *Flavobacterium* (Hibi et al. (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48 (2): 121-4; Michelacci et al. (1976) J. Biol. Chem. 251: 1154-8; Tsuda et al. (1999) Eur. J. Biochem. 262: 127-133).

45 c. Enzimas solubles de degradación de hialuronano (p. ej., PH20 soluble)

En las composiciones, combinaciones y combinaciones para su uso en la presente memoria se proporcionan enzimas solubles de degradación de hialuronano, incluidas las hialuronidasas solubles. Las enzimas de degradación de hialuronano solubles incluyen cualquier enzima de degradación de hialuronano que sea secretada de las células (p. ej., célula CHO) tras la expresión y exista en forma soluble. Tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas solubles, incluyendo hialuronidasas solubles animales no humanas, y hialuronidasas humanas, tales como Hyal1, PH20 bovina, PH20 ovina, y cualquier enzima de degradación de hialuronano que se haya modificado para que sea soluble, y variantes alélicas de las mismos y otras variantes de las mismas. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano que contienen un ancla de GPI se pueden hacer solubles mediante el truncamiento C-terminal y la eliminación de toda o una parte del ancla de GPI. En un ejemplo, una hialuronidasa soluble es una PH20 humana truncada en el extremo C en la que la hialuronidasa PH20 humana, que normalmente está anclada a la membrana a través de un ancla de GPI, está truncada y carece de toda o una parte del ancla de GPI en el extremo C-terminal.

Las enzimas de degradación de hialuronano solubles también incluyen hialuronidasas activas en condiciones neutras y activas en condiciones ácidas. Dependiendo de factores, tales como, pero no limitados a, el nivel deseado de actividad de la enzima después de la administración y/o el sitio de administración, se pueden seleccionar hialuronidasas activas en condiciones neutras y activas en condiciones ácidas. En un ejemplo particular, la enzima de degradación de hialuronano para su uso en las composiciones, combinaciones y combinaciones para su uso en la presente memoria es una hialuronidasa activa en condiciones neutras, soluble.

Tales formas solubles incluyen formas truncadas de las mismas que carecen de toda o una parte del ancla de GPI C-terminal, siempre que la hialuronidasa sea soluble (secretada tras la expresión) y conserve la actividad de la hialuronidasa (véanse, p. ej., también las Patentes de Estados Unidos Núm. 8.431.380 y 7.767.429). Tales formas también suelen ser formas maduras que, cuando se expresan en una célula, carecen del péptido señal. Las hialuronidasas ilustrativas incluyen formas solubles de una PH20 de cualquier especie, tal como una forma soluble de una PH20 de cualquiera de SEQ ID NO: 122, 159, 160, 161-170, 177, 178, 185-187, 196, 197, 203, 206, 201, 202, 204 y 217. También se incluyen entre las hialuronidasas solubles las formas solubles de variantes de cualquiera de las PH20 de cualquier especie expuesta en SEQ ID NO: 122, 159, 160, 161-170, 177, 178, 185-187, 196, 197, 203, 206, 201, 202, 204, 217, o formas truncadas de las mismas, que muestran actividad hialuronidasa. Las variantes incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 122, 159, 160, 161-170, 177, 178, 185-187, 196, 197, 203, 206, 201, 202, 204 o 217, y las formas maduras (p. ej., que carecen de la secuencia señal) o solubles truncadas de la misma. Las variantes de aminoácidos incluyen mutaciones conservativas y no conservativas. Se entiende que los residuos que son importantes o que se requieren de otro modo para la actividad de una hialuronidasa, tal como cualquiera de los descritos anteriormente o conocidos por los expertos en la técnica, son generalmente invariables y no se pueden cambiar. Estos incluyen, por ejemplo, residuos de sitios activos. Así, por ejemplo, los residuos de aminoácidos 111, 113 y 176 (correspondientes a los residuos del polipéptido de PH20 maduro expuesto en SEQ ID NO: 122) de un polipéptido de PH20 humano, o una forma soluble del mismo, son generalmente invariables y no están alterados. Otros residuos que confieren glicosilación y formación de enlaces disulfuro requeridos para un plegamiento adecuado también pueden ser invariables. Las formas modificadas de las enzimas PH20 solubles también son conocidas (véase, la Publicación de Estados Unidos Núm. US-2013-0302275), que incluyen enzimas PH20 que tienen una estabilidad mejorada en condiciones de desnaturalización, tales como aquellas que incluyen el reemplazo del residuo correspondiente a 204 (de la PH20 humana completa) por prolina (P).

En algunos casos, la enzima de degradación de hialuronano soluble está normalmente anclada a GPI (tal como, por ejemplo, la PH20 humana) y se vuelve soluble por truncamiento en el extremo C-terminal. Tal truncamiento puede eliminar toda la secuencia señal de anclaje al ancla de GPI, o puede eliminar solamente parte de la secuencia de señal de anclaje al ancla de GPI. El polipéptido resultante, sin embargo, es soluble. En los casos en que la enzima de degradación de hialuronano soluble conserva una parte de la secuencia señal de anclaje al ancla GPI, se pueden conservar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos de aminoácidos en la secuencia de señal de anclaje al ancla GPI, siempre que el polipéptido sea soluble. Los polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos del ancla de GPI se denominan enzimas de degradación de hialuronano solubles extendidas. Un experto en la técnica puede determinar si un polipéptido está anclado a GPI usando métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, el uso de algoritmos conocidos para predecir la presencia y ubicación de la secuencia señal de anclaje al ancla de GPI y el sitio ω , y la realización de análisis de solubilidad antes y después de la digestión con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) o D (PI-PLD).

Las enzimas de degradación de hialuronano solubles extendidas se pueden producir realizando truncamientos C-terminales en cualquier enzima de degradación de hialuronano naturalmente anclada a GPI de modo que el polipéptido resultante sea soluble y contenga uno o más residuos de aminoácido de la secuencia señal de anclaje al ancla de GPI (véase p. ej., la Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada Núm. US20100143457). Las enzimas de degradación de hialuronano solubles extendidas ilustrativas que están truncadas en el extremo C pero que conservan una parte de la secuencia señal de anclaje el ancla GPI incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de PH20 solubles extendidos (esPH20) de primate, tales como, por ejemplo, polipéptidos de esPH20 de ser humano y de chimpancé. Por ejemplo, los polipéptidos de esPH20 se pueden elaborar mediante el truncamiento C-terminal de cualquiera de los polipéptidos maduros o precursores expuestos en SEQ ID NO: 122, 179, 180 o 204, o 217, u otras variantes de los mismos, incluyendo su fragmento activo, en donde el polipéptido resultante es soluble y conserva uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de señal de anclaje al ancla de GPI. Las variantes incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 122, 179, 180 o 204, o 217 que conservan la actividad hialuronidasa. Los polipéptidos de esPH20 proporcionados en la presente memoria se pueden truncar en el extremo C en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo salvaje, tal como un polipéptido con un conjunto de secuencias expuesto en SEQ ID NO: 122, 179, 180 o 204, o 217, siempre que el polipéptido de esPH20 resultante sea soluble y conserve 1 o más residuos de aminoácido de la secuencia de señal de anclaje unión al ancla de GPI.

Típicamente, para uso en las composiciones, combinaciones y combinaciones para su uso en la presente memoria, se utiliza una enzima de degradación de hialuronano humana soluble, tal como una PH20 humana soluble. Aunque se pueden utilizar enzimas de degradación de hialuronano, tales como el PH20, de otros animales, tales preparaciones son potencialmente inmunogénicas, ya que son proteínas animales. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demuestra una sensibilización previa secundaria a los alimentos ingeridos, y puesto que se trata de proteínas animales, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización posterior. Por lo tanto, las preparaciones no humanas pueden no ser adecuadas para uso crónico. Si se desean preparaciones no humanas,

se contempla en la presente memoria que tales polipéptidos se puedan preparar para que tengan una inmunogenicidad reducida. Tales modificaciones están dentro del nivel de un experto en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, la eliminación y/o sustitución de uno o más epítopos antígenicos en la molécula.

Las enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo las hialuronidasas (p. ej., PH20), utilizadas en las combinaciones para su uso en la presente memoria se pueden producir de forma recombinante o se pueden purificar o purificar parcialmente a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, a partir de extractos de testículo. Los métodos para la producción de proteínas recombinantes, incluidas las enzimas de degradación de hialuronano recombinantes, se proporcionan en otras partes de la presente memoria y son bien conocidos en la técnica.

i. PH20 humana soluble

La PH20 humana soluble es un ejemplo de una hialuronidasa soluble. Se han producido formas solubles de PH20 humana recombinante y se pueden utilizar en las composiciones, combinaciones y combinaciones para su uso descrito en la presente memoria. La producción de tales formas solubles de PH20 se describe en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Publicadas US20040268425; US20050260186, US20060104968, US20100143457 y en la Publicación internacional PCT Núm. WO2009111066. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 solubles incluyen polipéptidos variantes truncados en el extremo C que incluyen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 217 o 122, o tienen al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97% o 98% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos incluida en SEQ ID NO: 217 o 122, conservan la actividad de hialuronidasa y son solubles. Entre estos polipéptidos se incluyen los polipéptidos de PH20 solubles que carecen completamente de toda o una parte de la secuencia señal de anclaje al ancla de GPI.

También se incluyen los polipéptidos de PH20 solubles extendidos (esPH20) que contienen al menos un aminoácido del ancla de GPI. Por lo tanto, en lugar de tener un ancla de GPI covalentemente anclada al extremo C de la proteína en el RE y estar anclados a la lámina extracelular de la membrana plasmática, estos polipéptidos se secretan y son solubles. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C pueden estar truncados en el extremo C 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 salvaje completo, tal como un polipéptido de tipo salvaje completo con una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 217 o 122, o variantes alélicas o de especies u otras variantes de los mismos.

Las formas solubles de la PH20 humana generalmente incluyen aquellas que contienen los aminoácidos 36-464 expuestos en SEQ ID NO: 217. Por ejemplo, las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos truncados C-terminalmente de la PH20 humana expuesta en SEQ ID NO: 217 que tiene un residuo de aminoácido C-terminal 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 477, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486 , 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 217, las formas maduras de los mismos o los polipéptidos que muestran al menos 85% de identidad con los mismos. Por ejemplo, cuando se expresa en células de mamíferos, la secuencia señal N-terminal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína se produce y se puede secretar. De este modo, los polipéptidos solubles maduros contienen los aminoácidos 36 a 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 477, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de SEQ ID NO: 217. La Tabla 4 proporciona ejemplos no limitantes de polipéptidos de PH20 solubles truncados en el extremo C, que incluyen precursores y formas maduras de los mismos. En la Tabla 4 a continuación, se proporcionan la longitud (en aminoácidos) de los polipéptidos precursores y maduros, y el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en la que se exponen las secuencias de aminoácidos ilustrativas de los polipéptidos precursores y maduros de las proteínas PH20 truncadas en el extremo C. El polipéptido de PH20 de tipo salvaje también se incluye en la Tabla 4 para su comparación. En particular, las hialuronidasas solubles ilustrativas son polipéptidos de PH20 humanos solubles que tienen una longitud de 442, 443, 444, 445, 446 o 447 aminoácidos, tales como los que se exponen en SEQ ID NO: 123-128, o variantes alélicas o de especies u otras variantes de los mismos.

Tabla 4. Polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C ilustrativos					
Precursor			Maduro		
Aminoácidos de SEQ ID NO: 217	longitud (aa)	SEQ ID NO	Aminoácidos de SEQ ID NO: 217	longitud (aa)	SEQ ID NO
1-509*	509	217	36-509**	474	122
1-500	500	216	36-500	465	152
1-499	499	215	36-499	464	131
1-498	498	214	36-498	463	153
1-497	497	213	36-497	462	132
1-496	496	212	36-496	461	154
1-495	495	211	36-495	460	133
1-494	494	210	36-494	459	155
1-493	493	209	36-493	458	134
1-492	492	208	36-492	457	156
1-491	491	207	36-491	456	135
1-490	490	281	36-490	455	137
1-489	489	280	36-489	454	136
1-488	488	279	36-488	453	157
1-487	487	278	36-487	452	138
1-486	486	277	36-486	451	158
1-485	485	276	36-485	450	139
1-484	484	275	36-484	449	140
1-483	483	274	36-483	448	130
1-482	482	273	36-482	447	123
1-481	481	272	36-481	446	124
1-480	480	271	36-480	445	125
1-479	479	270	36-479	444	126
1-478	478	269	36-478	443	127
1-477	477	268	36-477	442	128
1-476	476	267	36-476	441	141
1-475	475	266	36-475	440	142
1-474	474	265	36-474	439	143
1-473	473	264	36-473	438	144
1-472	472	263	36-472	437	145
1-471	471	262	36-471	436	146
1-470	470	261	36-470	435	147
1-469	469	260	36-469	434	148
1-468	468	259	36-468	433	149
1-467	467	258	36-467	432	129

Tabla 4. Polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C ilustrativos

Precursor			Maduro		
Aminoácidos de SEQ ID NO: 217	longitud (aa)	SEQ ID NO	Aminoácidos de SEQ ID NO: 217	longitud (aa)	SEQ ID NO
1-466	466	257	36-466	431	150
1-465	465	256	36-465	430	151
* PH20 precursor de tipo salvaje					
** PH20 maduro de tipo salvaje					

Por ejemplo, las formas solubles de PH20 incluyen, por ejemplo, polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 85%, 86%, 87 %, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOS: 123-158 y son solubles y conservan la actividad hialuronidasa.

Las variantes de PH20, tales como una PH20 humana (p. ej., una PH20 humana soluble) son conocidas y se describen en la Solicitud Publicada de Estados Unidos Núm. US2013/0302275. Cualquier variante de PH20 descrita en la Solicitud Publicada de Estados Unidos Núm. US2013/0302275 se puede incorporar a un polipéptido de PH20 soluble para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. Tales variantes incluyen aquellas que muestran una mayor resistencia a las condiciones de desnaturalización (p. ej., un conservante fenólico) o una mayor actividad. Un ejemplo de tal polipéptido es una PH20 humana soluble que contiene el reemplazo de aminoácido F204P, V58K o V58R con referencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en la PH20 humana completa expuesta en SEQ ID NO: 122 o en una PH20 humana soluble expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158.

Generalmente, las formas solubles de PH20 se producen utilizando sistemas de expresión de proteínas que facilitan la correcta glicosilación en N para asegurar que el polipéptido conserve la actividad, ya que la glicosilación es importante para la actividad catalítica y la estabilidad de las hialuronidasas. Tales células incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) (p. ej., células CHO DG44).

ii. rHuPH20

Se han generado formas solubles recombinantes de PH20 humana y se pueden utilizar en las composiciones, combinaciones y combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria. La generación de tales formas solubles de PH20 humana recombinante se describen, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente Publicadas de Estados Unidos US20040268425; US 20050260186; US20060104968; US20100143457; y la Solicitud Internacional PCT. Núm. WO2009111066. Los ejemplos de tales polipéptidos son los generados por la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1-482 (expuestos en SEQ ID NO: 273). Tal molécula de ácido nucleico ilustrativa se expone en SEQ ID NO: 5. El procesamiento posterior a la traducción elimina la secuencia señal de 35 aminoácidos, dejando una PH20 humana recombinante soluble de 447 aminoácidos (SEQ ID NO: 123). Tal como se produce en el medio de cultivo, existe heterogeneidad en el extremo C, de manera que el producto, designado rHuPH20, incluye una mezcla de especies que puede incluir uno o más de SEQ ID NO. 123-128 en diversa abundancia. Normalmente, la rHuPH20 se produce en células que facilitan la correcta glicosilación en N para conservar la actividad, tales como las células CHO (p. ej., células CHO DG44).

D. Glicosilación de enzimas de degradación de hialuronano

La glicosilación, incluyendo la glicosilación ligada a N y O, de algunas enzimas de degradación de hialuronano, incluidas las hialuronidasas, puede ser importante por su actividad catalítica y estabilidad. Si bien la alteración del tipo de glicano que modifica una glicoproteína puede tener efectos drásticos sobre la antigenicidad, el plegamiento estructural, la solubilidad y la estabilidad de una proteína, no se cree que la mayoría de las enzimas requieran glicosilación para una actividad enzimática óptima. Para algunas hialuronidasas, la eliminación de la glicosilación ligada a N puede dar como resultado una inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. Por lo tanto, para tales hialuronidasas, la presencia de glicanos unidos a N es crítica para generar una enzima activa.

Los oligosacáridos unidos a N se clasifican en varios tipos principales (oligomanosa, complejo, híbrido, sulfatado), todos los cuales tienen núcleos (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc anclados a través del nitrógeno amídico de los residuos de Asn que caen dentro de las secuencias -Asn-Xaa-Thr/Ser- (donde Xaa no es Pro). Se ha informado sobre la glicosilación en un sitio -Asn-Xaa-Cys para la proteína de coagulación C. En algunos casos, una enzima de

degradación de hialuronano, tal como la hialuronidasa, puede contener enlaces tanto N-glicosídicos y O-glicosídicos. Por ejemplo, la PH20 tiene oligosacáridos unidos a O así como oligosacáridos unidos a N. Existen seis sitios potenciales de glicosilación unida a N en N82, N166, N235, N254, N368, N393 de la PH20 humana ilustrada en SEQ ID NO: 217. 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 alto contenido de manosa. El residuo de aminoácido N235 está ocupado por aproximadamente 80% de glicanos de tipo alto contenido de manosa y 20% de glicanos de tipo complejo. Como se señaló anteriormente, la glicosilación unida a O en S490 no es necesaria para la actividad de la hialuronidasa.

En algunos ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano para su uso en las composiciones, combinaciones y/o combinaciones para su uso proporcionadas están glicosiladas en uno o en todos los sitios de glicosilación. Por ejemplo, para la PH20 humana, o una forma soluble de la misma, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 217 están glicosilados. En otros ejemplos, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 217 están glicosilados. Típicamente, al menos los residuos 235, 368 y 393 están glicosilados. Los residuos de aminoácidos glicosilados contienen mínimamente un radical N-acetilglucosamina.

En algunos ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano están glicosiladas en uno o más sitios de glicosilación nativos. En otros ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano se modifican en uno o más sitios de glicosilación no nativos para conferir glicosilación del polipéptido en uno o más sitios adicionales. En tales ejemplos, el anclaje de radicales azúcar adicionales puede mejorar las propiedades farmacocinéticas de la molécula, tal como una mejora de la semi-vida y/o una mejora de la actividad.

e. Formulaciones de liberación sostenida o controlada y vectores que codifican hialuronidasas solubles

Los expertos en la técnica conocen diversas estrategias para aumentar la semivida en suero de enzimas de degradación de hialuronano, tales como las hialuronidasas, que son ventajosas para la administración sistémica de las hialuronidasas. En general, la enzima de degradación de hialuronano se modifica, tal como por pegilación o sialación. También se pueden emplear otras estrategias. Estas incluyen la formulación de enzimas de degradación de hialuronano para la liberación sostenida, tal como en vesículas, incluyendo liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o una liberación retardada de la enzima de degradación de hialuronano, y/o pueden ser dirigidas al tumor para su liberación en el tumor. Los ejemplos de tales formulaciones de enzimas de degradación de hialuronano, tales como las hialuronidasas solubles, son las descritas en la Publicación de Estados Unidos US-2013-0251786-A1 y la Publicación de la Solicitud Internacional PCT Núm. WO 2012/109387. Las enzimas de degradación de hialuronano también pueden estar codificadas en vectores de expresión para su expresión *in vivo*, en particular vectores dirigidos a tumores u oncolíticos para su expresión en células tumorales (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 8.450.470, y la Publicación de Estados Unidos Núm. 2011-0152359-A1; véase también la Publicación de Estados Unidos Núm. US- 2012-0148535). Las combinaciones para su uso en la presente memoria se pueden practicar con las formulaciones vesiculares y/o vectores de expresión que codifican hialuronidasas solubles, que se pueden administrar a un sujeto para terapia combinada con un inhibidor de puntos de control. Las formulaciones de liberación sostenida también se pueden formular para que contengan el inhibidor de puntos de control, incluyendo cualquiera de los descritos en la presente memoria, en particular los anticuerpos inhibidores de puntos de control, tales como anti-PD-L1 y anti-CTLA4.

i. Enzimas de degradación de hialuronano modificadas (conjugadas con polímero)

El anclaje covalente u otro anclaje estable (conjugación) de moléculas poliméricas, tales como el polietilenglicol (radical de PEGilación (PEG)), a las enzimas de degradación de hialuronano, tales como las hialuronidasas, confieren propiedades beneficiosas a la composición de enzima de degradación de hialuronano polímero resultante. Tales propiedades incluyen una mejora de la biocompatibilidad, una prolongación de la semivida de la proteína (y la actividad enzimática) en la sangre, las células y/o en otros tejidos dentro de un sujeto, la protección eficaz de la proteína frente a las proteasas y la hidrólisis, una mejor biodistribución, una mejora de la farmacocinética y/o farmacodinamia, y aumento de la solubilidad en agua.

Los polímeros ilustrativos que se pueden conjugar con la enzima de degradación de hialuronano, tal como la hialuronidasa, incluyen homopolímeros naturales y sintéticos, tales como polioles (es decir, poli-OH), poliaminas (es decir, poli-NH₂) y poli(ácidos carboxílicos) (es decir, poli-COOH), y otros heteropolímeros es decir, polímeros que comprenden uno o más grupos de acoplamiento diferentes p. ej., un grupo hidroxilo y grupos amina. Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas entre los poli(óxidos de alquilenos) (PAO), tales como polialquilenglicoles (PAG), que incluyen polietilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, PEG-glicidil éteres (Epo-PEG), PEG-oxicarboxilimidazol (CDI-PEG), polietilenglicoles ramificados (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(etilenimina) (PEI), poliamidoaminas lineales, poliacrilamida (PAAm), polidimetilacrilamida (PDAAm), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona (PVP), poli-D,L-aminoácidos, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido

de ácido maleico, dextranos, incluyendo carboximetil-quitosano, dextrina, dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, productos hidrolizados de quitosano, almidones tales como hidroxietilalmidones y hidroxipropilalmidones, glucógeno, agarosas y derivados de las mismas, goma guar, pululano, inulina, goma xantana, carragenina, pectina, productos hidrolizados de ácido algínico y biopolímeros.

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

Se ha informado que la PEGilación de los agentes terapéuticos aumenta la resistencia a la proteólisis, aumenta la semi-vida en plasma y disminuye la antigenicidad y la inmunogenicidad. En la técnica se conocen ejemplos de metodologías de PEGilación (véanse, por ejemplo, Lu y Felix, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 43:127-138, 1994; Lu y Felix, *Peptide Res.*, 6:140-6, 1993; Felix et al., *Int. J. Peptide Res.*, 46:253-64, 1995; Benhar et al., *J. Biol. Chem.*, 269:13398-404, 1994; Brumeanu et al., *J. Immunol.*, 154:3088-95, 1995; véase también, Caliceti et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). La PEGilación también se puede utilizar en la administración de moléculas de ácido nucleico *in vivo*. La PEGilación de adenovirus puede aumentar la estabilidad y la transferencia de genes (véase, p. ej., Cheng et al. (2003) *Pharm. Res.* 20(9):1444-51).

Las moléculas poliméricas adecuadas para el anclaje a las enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo las hialuronidasas, incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG tales como metoxipolietilenglicoles (mPEG), PEG-glicidiléteres (Epoxy-PEG) PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), PEG ramificados y poli(óxido de etileno) (PEO) (véanse p. ej., Roberts et al., *Advanced Drug Delivery Review* (2002) 54: 459-476; Harris y Zalipsky, S (eds.) "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar et al., *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1):125-136, 2000; Harris, (2003) *Nature Reviews Drug Discovery* 2:214-221; y Tsubery, (2004) *J. Biol. Chem.* 279(37):38118-24). La molécula polimérica puede tener cualquier peso molecular que oscile típicamente entre aproximadamente 3 kDa y aproximadamente 60 kDa. En algunas realizaciones la molécula polimérica que está conjugada con una proteína, tal como una hialuronidasa, por ejemplo una PH20, tiene un peso molecular entre o aproximadamente entre 5 y 60 kDa, tal como al menos o aproximadamente al menos o 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más de 60 kDa.

Enzimas de degradación de hialuronano solubles PEGiladas

La enzima de degradación de hialuronano utilizada en las combinaciones y combinaciones para su uso en la presente memoria puede ser una enzima de degradación de hialuronano PEGilada, tal como una enzima de degradación de hialuronano soluble PEGilada. En un ejemplo, es una hialuronidasa soluble PEGilada, p. ej., una PH20 PEGilada. Se conocen en la técnica varios métodos para modificar polipéptidos anclando covalentemente (conjugando) un PEG o un derivado de PEG (es decir, "PEGilación") (véanse p. ej., los documentos U.S. 2006/0104968; U.S. 5.672.662; U.S. 6.737.505; y U.S. 2004/0235734). Las técnicas para la PEGilación incluyen, pero no se limitan a, conectores y químicas de acoplamiento especializados (véase p. ej., Roberts et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476, 2002), el anclaje de múltiples radicales de PEG a un solo sitio de conjugación (tal como a través del uso de PEG ramificados; véase p. ej., Guiotto et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), PEGilación específica del sitio y/o mono-PEGilación (véase p. ej., Chapman et al., *Nature Biotech.* 17: 780-783, 1999), y PEGilación enzimática dirigida al sitio (véase p. ej., Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002). Los métodos y mecanismos descritos en la técnica pueden producir proteínas que tengan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 PEG o derivados de PEG unidos a una única molécula de proteína (véase p. ej., el documento U.S. 2006/0104968).

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, mPEG-alfa-metilbutanoato de succinimidilo, mPEG-propionato de succinimidilo, mPEG-butanoato de succinimidilo, mPEG-éster de succinimidilo de ácido carboximetilo, PEG-propionato de succinimidilo homobifuncional, PEG-propionaldehído homobifuncional, PEG-butilaldehído homobifuncional, PEG-maleimida, PEG-hidrazida, carbonato de p-nitrofenilo-PEG, mPEG-carbonato de benzotriazol, propionaldehído-PEG, mPEG-butilaldehído, mPEG₂-butilaldehído ramificado, mPEG-acetilo, mPEG-piperidona, mPEG-metilcetona, mPEG-maleimida "sin conector", mPEG-vinil sulfona, mPEG-tiol, mPEG-ortopiridiléster, mPEG-disulfuro de ortopiridilo, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona-PEG-NHS, acrilato-PEG-NHS, fluoresceína-PEG-NHS, y biotina-PEG-NHS (véase p. ej., Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6:62-69, 1995; Veronese et al., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; Documentos U.S. 5.672.662; U.S. 5.932.462; U.S. 6.495.659; U.S. 6.737.505; U.S. 4.002.531; U.S. 4.179.337; U.S. 5.122.614; U.S. 5.324.844; U.S. 5.446.090; U.S. 5.612.460; U.S. 5.643.575; U.S. 5.766.581; U.S. 5.795.569; U.S. 5.808.096; U.S. 5.900.461; U.S. 5.919.455; U.S. 5.985.263; U.S. 5.990.237; U.S. 6.113.906; U.S. 6.214.966; U.S. 6.258.351; U.S. 6.340.742; U.S. 6.413.507; U.S. 6.420.339; U.S. 6.437.025; U.S. 6.448.369; U.S. 6.461.802; U.S.

6.828.401; U.S. 6.858.736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; U.S. 2004/0235734; WO0500360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 1064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

ii. Formulaciones de liberación sostenida o controlada y vectores que codifican hialuronidasas solubles

ii. Formulaciones de liberación sostenida

Las composiciones de enzimas de degradación de hialuronano se pueden proporcionar en formulaciones de liberación sostenida o controlada. Se pueden coformular con el inhibidor de puntos de control y/u otro agente antitumoral. En algunos ejemplos, las formulaciones de liberación sostenida o controlada también contienen otro u otros agentes terapéuticos, por ejemplo, el inhibidor de puntos de control y/o un agente antitumoral adicional. La enzima de degradación de hialuronano, tal como las hialuronidasas solubles, se puede proporcionar en vectores para su administración. Los vectores incluyen vectores virales oncolíticos, tales como vectores oncolíticos de adenovirus y virus vaccinia que codifican y expresan la enzima de degradación de hialuronano. También pueden codificar otros agentes terapéuticos de proteínas contra el cáncer, tales como el inhibidor de puntos de control, incluyendo los descritos en la presente memoria.

Las formulaciones se pueden formular para inyección local o sistémica. Las formulaciones de liberación sostenida ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, vesículas lipídicas incluyendo vesículas unilamelares (LUV) y vesículas multilamelares (MVL), complejos de fármaco-resina (resinatos) y formulaciones de depósito. Tales formulaciones de liberación sostenida o controlada son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano se puede encapsular en un sistema de dispersión coloidal o en cristales estabilizados con polímeros. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen nanocápsulas, microesferas, cuentas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.631.018). En la técnica se conocen ejemplos de procedimientos para elaborar liposomas multilamelares y unilamelares (véase p.ej. las Patente de Estados Unidos Núm. 4.522.803, 4.310.506, 4.235.871, 4.224.179, 4.078.052, 4.394.372, 4.308.166, 4.485.054 y 4.508.703). Otros ejemplos de vehículos de suministro de liberación lenta son las matrices de hidrogel biodegradables (Patente de Estados Unidos Núm. 5.041.292), los productos conjugados de polímeros dendríticos (Patente de Estados Unidos Núm. 5.714.166), y los liposomas multivesiculares (DepoFoam®, DepoTech, San Diego, California) (Patentes de Estados Unidos Núm. 5.723.147 y 5.766.627). Un tipo de microesferas adecuadas para encapsular las composiciones para inyección local, son las microesferas de poli(D,L-lactida), como describen Fletcher, D. Anesth. Analg 84: 90-94 (1997).

En particular, las formulaciones de liberación sostenida proporcionadas se pueden diseñar de manera tal que la enzima (u otro agente o agentes) se libere a una velocidad predeterminada o de manera tal que se mantenga un nivel constante de fármaco durante un período específico de tiempo. En particular, las formulaciones permiten una liberación controlada de la enzima de degradación de hialuronano (u otro agente o agentes) al tejido local, tal como el tejido tumoral. La velocidad de liberación es lo suficientemente lenta como para que el efecto resultante de la enzima sobre la degradación de HA en el tejido (p. ej., el estroma) se prolongue durante muchas horas, días, semanas o meses. Los expertos en la técnica pueden determinar la velocidad de liberación y la duración óptimas para las formulaciones de liberación sostenida de una enzima de degradación de hialuronano basándose en las propiedades farmacológicas de los agentes específicos.

Si es necesario, se puede medir la actividad de la enzima de degradación de hialuronano liberada en la sangre o el suero. Se puede realizar cualquier ensayo conocido por un experto en la técnica para medir la hialuronidasa en el plasma. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de microturbidez o un ensayo enzimático en las proteínas en plasma. Se entiende que el plasma normalmente contiene enzimas hialuronidasas. Tales enzimas hialuronidasas plasmáticas tienen típicamente actividad a un pH ácido (Patente de Estados Unidos Núm. 7.105.330). Por lo tanto, antes del tratamiento con una formulación de liberación sostenida como se describe en la presente memoria, se deben determinar los niveles plasmáticos de hialuronidasa y utilizarlos como una referencia. Las mediciones posteriores de los niveles de hialuronidasa en plasma después del tratamiento se pueden comparar con los niveles antes de los tratamientos. Alternativamente, el ensayo se puede realizar en condiciones de pH que suprimen la actividad hialuronidasa lisosomal endógena en plasma, que normalmente muestra actividad a pH ácido. Por lo tanto, cuando la enzima de degradación de hialuronano es activa a pH neutro (p. ej., la PH20 humana), solamente se mide el nivel de la enzima activa en condiciones neutras.

Adicionalmente, las formulaciones de liberación sostenida proporcionadas en la presente memoria pueden diseñarse de manera tal que la enzima de degradación de hialuronano sea relativamente estable y activa. Por ejemplo, las formulaciones de liberación sostenida se proporcionan de tal manera que la actividad de la enzima de degradación de hialuronano total de la formulación sea de o entre 25.000 U/mg a 200.000 U/mg, por ejemplo de 40.000 U/mg a 150.000 U/mg, tal como de 75.000 U/mg a 120.000 U/mg y en particular al menos o 40.000 U/mg, 50.000 U/mg,

60.000 U/mg, 70.000 U/mg, 80.000 U/mg, 90.000 U/mg, 100.000 U/mg, 110.000 U/mg, 120.000 U/mg, 130.000 U/mg, 140.000 U/mg, 150.000 U/mg o más.

5 Los ejemplos no limitantes de formulaciones de liberación sostenida y formulaciones ilustrativas se proporcionan en los ejemplos a continuación. Véase, también la Solicitud PCT publicada WO 2012/109387.

a) Liposomas multivesiculares (MVL)

10 En la presente memoria se proporcionan vesículas de membrana sintética, tales como formulaciones de liposomas multivesiculares (MVL), que incluyen la enzima de degradación de hialuronano, y en particular una hialuronidasa tal como PH20 o PH20 soluble o recombinante. En algunos ejemplos, se proporcionan co-formulaciones de MVL que además contienen otro fármaco terapéutico, tal como el inhibidor de puntos de control y/u otro agente antitumoral o anticancerígeno. Las formulaciones de liposomas multivesiculares contienen partículas microscópicas esféricas compuestas por numerosas cámaras acuosas no concéntricas que encapsulan un fármaco o agente que se va a suministrar. Las cámaras individuales están separadas por membranas de bicapa lipídica compuestas por duplicados sintéticos o lípidos naturales, lo que da como resultado un vehículo de suministro que es biocompatible y biodegradable. En los ejemplos de la presente memoria, las enzimas de degradación de hialuronano u otros agentes terapéuticos que son hidrófilos se pueden encapsular en la fase acuosa. En otros ejemplos en la presente memoria, se proporciona una co-formulación de MVL mediante co-encapsulación de un fármaco hidrófilo y un fármaco hidrófobo en la misma formulación. Por ejemplo, en tales co-formulaciones de MVL, la enzima de degradación de hialuronano se encapsula en la fase acuosa y un fármaco hidrófobo, por ejemplo, finasterida o dutasterida, se intercala en la fase lipídica.

25 Las vesículas de membrana se pueden utilizar en métodos para administrar una enzima de degradación de hialuronano y, si se desea, también otro agente, a un sujeto para ser utilizado como coadyuvante, agente de propagación o terapéutico. En particular, las vesículas de membrana se proporcionan en composiciones farmacéuticas para su uso como agente terapéutico.

30 Los liposomas multivesiculares (MVL) se elaboran basándose en procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (véanse p. ej. las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.723.147; 5.766.627; 6.106.858; 6.306.432; 5.962.016; 6.241.999; Solicitudes de Patente de Estados Unidos Publicadas Núm. US2007/0235889 y US2010/030550; y Solicitud Internacional Publicado Núm. WO02/096368). Al generar tales liposomas, cualquiera de las composiciones de enzimas de degradación de hialuronano descritas en la presente memoria, o conocidas por los expertos en la técnica, se puede preparar como parte de los liposomas multivesiculares. Brevemente, primero se prepara una emulsión de "agua en aceite" que contiene una enzima de degradación de hialuronano disolviendo los lípidos anfipáticos y los lípidos neutros en un solvente orgánico volátil para el componente lipídico, agregando al componente lipídico un primer componente acuoso inmiscible que contiene la enzima. y/u otro agente que se vaya a incluir, y una o más moléculas auxiliares, es decir excipientes osmóticos, que proporcionan propiedades útiles y beneficiosas a las MVL. La mezcla se emulsiona mezclando, por ejemplo, mecánicamente mediante mezclado, agitación, sonicación, por energía ultrasónica, atomización de boquillas o combinaciones de los mismos. La enzima de degradación de hialuronano puede estar contenida en el primer componente acuoso o en el componente lipídico o en ambos. La emulsión completa de agua en aceite se mezcla a continuación con el segundo componente acuoso y a continuación se agita mecánicamente, como anteriormente, para formar esférulas de disolvente suspendidas en el segundo componente acuoso. Las esferas de disolvente contienen múltiples gotitas acuosas con la sustancia que se va a encapsular disuelta en ellas. El solvente orgánico volátil se elimina, por ejemplo, por evaporación, de las esférulas. Cuando el disolvente se ha evaporado por completo, se forman liposomas multivesiculares. Las MVL se resuspenden, se lavan y se almacenan en una tercera solución acuosa, tal como solución salina o un tampón adecuado que permita la estabilidad de las partículas a las temperaturas de almacenamiento. Los gases representativos satisfactorios para su utilización en la evaporación del disolvente incluyen nitrógeno, helio, argón, oxígeno, hidrógeno y dióxido de carbono. Alternativamente, el solvente orgánico se puede eliminar mediante evaporación, evaporación rotatoria o membranas selectivas para disolventes.

55 Como se describe en la Solicitud PCT Publicada WO 2012/109387, las moléculas hidrófobas se pueden incorporar a la bicapa lipídica disolviendo los lípidos y el fármaco hidrófobo en un disolvente orgánico antes de mezclar con un primer componente acuoso que contenga el fármaco hidrófilo (p. ej. una enzima de degradación de hialuronano). Por lo tanto, los métodos se pueden utilizar para generar también co-formulaciones de MVL de un fármaco hidrófobo e hidrófilo.

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

Se pueden utilizar varios tipos de lípidos para preparar liposomas multivesiculares, siempre que el componente

lipídico contenga un lípido neutro y un lípido anfipático. Los ejemplos de lípidos neutros incluyen diglicéridos, tales como dioleína, dipalmitoleína; ésteres de propilenglicol tales como diésteres mixtos de ácidos caprílico/cáprico en propilenglicol; triglicéridos tales como trioleína, tripalmitoleína, trilinoleína, tricaprilina y trilaurina; aceites vegetales, tales como aceite de soja; manteca de cerdo o grasa de res; escualeno; tocoferol; y combinaciones de los mismos.

En ejemplos particulares, los lípidos neutros de liberación lenta incluyen, por ejemplo, trioleína, tripalmitoleína, trimiristoleína, trilaurina y tricaprina. Los lípidos neutros de liberación rápida incluyen, por ejemplo, tricaprilina y tricaproína y mezclas de los mismos. Los ejemplos de lípidos anfipáticos incluyen aquellos con carga neta negativa, carga neta cero y carga neta positiva a pH 7,4. Estos incluyen lípidos zwitteriónicos, ácidos o catiónicos. Tales lípidos anfipáticos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina, diacil trimetilamonio propano (DITAP) y combinaciones de los mismos. Además, se pueden utilizar el colesterol o los esteroides vegetales para preparar liposomas multivesiculares. El componente lipídico elegido también puede ser uno que tenga un punto de fusión por debajo de la temperatura a la que se almacena y/o utiliza el MVL (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 5.962.016).

En ejemplos de las vesículas de membrana sintética, se puede preparar la enzima de degradación de hialuronano, y en particular una hialuronidasa tal como PH20 o PH20 recombinante, en presencia de uno o más excipientes que preservan o mejoran la estabilidad de la enzima y/o aumentan la velocidad de formación de las vesículas. En ejemplos particulares, el excipiente es ácido hialurónico (también llamado hialuronano; HA).

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

Las formulaciones o las coformulaciones de MVL resultantes se pueden diluir o suspender adicionalmente mediante la adición de medio de suspensión u otro portador biológicamente aceptable para obtener formulaciones de depósito de liberación lenta inyectables o implantables. Los portadores adecuados comunes incluyen soluciones suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de soluciones no acuosas son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones acuosas alcohólicas, emulsiones o suspensiones, incluyendo medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen soluciones de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y solución de Ringer con lactato añadido. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de líquidos y nutrientes, reforzadores de electrolitos (tales como los que se basan en la dextrosa de Ringer). También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, A. Oslo, ed., Mack, Easton, Pa. 1980). Los detalles adicionales para la preparación de las vesículas se describen, por ejemplo, en la Solicitud PCT publicada WO 2012/109387 y, por lo tanto, son conocidos por los expertos en la técnica.

b) Co-Formulaciones de MVL

En la presente memoria se proporcionan vesículas que contienen otro agente terapéutico o agente con la enzima de degradación de hialuronano. El otro agente terapéutico puede ser cualquier fármaco o agente conocido por un experto en la técnica, y particularmente incluye un inhibidor de puntos de control y/u otro agente anticanceroso. El otro agente puede ser hidrófilo o hidrófobo. En algunos ejemplos, las co-formulaciones de MVL se preparan mezclando un primer componente acuoso que contiene la enzima de degradación de hialuronano y otro agente con el componente lipídico en un disolvente orgánico. En otros ejemplos, el otro agente es un fármaco hidrófobo y las co-formulaciones de MVL se preparan mezclando un primer componente acuoso que contiene la enzima de degradación de hialuronano y con el componente lipídico en un disolvente orgánico que también contiene el fármaco hidrófobo. Se encuentra en la presente memoria que la inclusión del fármaco hidrófobo con el componente lipídico en un disolvente orgánico da como resultado la encapsulación o intercalación del fármaco hidrófobo en la fase lipídica de MVL. Por lo tanto, cuando se generan combinadas con una enzima de degradación de hialuronano, las formulaciones de MVL contienen un fármaco hidrófilo e hidrófobo coencapsulados en la misma formulación, por lo que la enzima de degradación de hialuronano está en la fase acuosa y el fármaco hidrófobo está en la fase lipídica. Los fármacos hidrófobos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, docetaxel, gemcitabina, glucocorticoides. Con respecto a la generación de co-formulaciones de MVL que contienen un fármaco hidrófobo, se encuentra en la presente memoria que la morfología de las partículas de co-formulación lipídicas puede verse afectada por la concentración del fármaco y la concentración de lípidos. Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar las concentraciones óptimas de fármaco y lípidos para obtener una partícula de morfología suficiente para aplicaciones terapéuticas a la vez que conserva la actividad de los fármacos encapsulados activos. Los Ejemplos ilustran procedimientos para evaluar y hacer un seguimiento de la morfología y las actividades

D. Métodos para producir ácidos nucleicos y polipéptidos codificados de enzimas de degradación de hialuronano e inhibidores de puntos de control inmunitario (p. ej., Anticuerpos)

Los polipéptidos que se utilizan en las combinaciones para su uso proporcionadas en la presente memoria, incluidos los polipéptidos de una enzima de degradación de hialuronano (p. ej., hialuronidasa soluble, tal como una PH20) o un inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., anticuerpo), se pueden obtener mediante métodos bien conocidos en la técnica para la purificación de proteínas y la expresión de proteínas recombinantes. Los métodos de ADN recombinante están dentro del alcance de los expertos en la técnica. El ADN que codifica un polipéptido de interés, tal como cualquiera de los descritos en la presente memoria, se puede producir sintéticamente o se puede aislar y secuenciar fácilmente utilizando procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes). Por ejemplo, cualquier fuente de células o tejido que se sabe que produce o expresa un polipéptido de interés, puede servir como fuente de dicho ADN. Los polipéptidos se pueden clonar o aislar utilizando cualquier método disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Tales métodos incluyen la amplificación por PCR de ácidos nucleicos y el escrutinio de bibliotecas, incluyendo el escrutinio por hibridación de ácidos nucleicos, el escrutinio basado en anticuerpos y el escrutinio basado en la actividad. En otro ejemplo, si la secuencia del ADN es conocida o determinada, se pueden construir las secuencias de ácido nucleico utilizando técnicas de síntesis de genes.

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

Además, las técnicas de mutagénesis también se pueden emplear para generar formas modificadas de una proteína de interés. El ADN también puede ser modificado. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de síntesis génica o biología molecular de rutina para efectuar la inserción, delección, adición o reemplazo de nucleótidos, por ejemplo, para alterar las propiedades de la proteína, tales como las propiedades de unión o la estabilidad del anticuerpo o la actividad enzimática de la enzima de degradación de hialuronano.

Se pueden unir secuencias de nucleótidos adicionales a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido. En un ejemplo, se pueden añadir secuencias conectoras, tales como secuencias que contienen sitios de endonucleasas de restricción con el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN codificantes de proteínas centrales. Además, se pueden unir operativamente secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido. Los ejemplos de tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteínas intracelulares, y secuencias de secreción, por ejemplo secuencias señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Tales secuencias son conocidas por los expertos en la técnica. Los residuos de nucleótidos adicionales, tales como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteínas, también se pueden unir a moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos. Tales regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la captación del polipéptido en células diana específicas, o alteran de otro modo la farmacocinética del producto del gen sintético.

Además, se pueden añadir etiquetas u otros radicales, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, también se pueden ligar secuencias de residuos de nucleótidos adicionales, tales como secuencias de bases que especifican una etiqueta epitópica u otro marcador detectable a moléculas de ácido nucleico que codifican enzimas. Los ejemplos de tales secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican una etiqueta His (p. ej., 6xHis, HHHHHH; SEQ ID NO: 31) o una etiqueta Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 20).

Los ácidos nucleicos identificados y aislados se pueden insertar a continuación en un vector de clonación apropiado. Se puede utilizar un gran número de sistemas de vector-anfitrión conocidos en la técnica. Los posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vectores debe ser compatible con la célula anfitriona utilizada. La elección del vector puede depender de la aplicación deseada. La inserción en un vector de clonación se puede lograr, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tenga extremos cohesivos complementarios. La inserción se puede efectuar utilizando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no están

presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN se pueden modificar enzimáticamente. Alternativamente, se puede producir cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (conectores) en los extremos del ADN; estos conectores ligados pueden contener oligonucleótidos específicos sintetizados químicamente que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de la proteína se pueden modificar mediante colas homopoliméricas.

Después de la inserción del ácido nucleico, los vectores típicamente se introducen en las células anfitrionas, por ejemplo, para amplificar los genes de proteínas para la replicación y/o expresión de los mismos. Las moléculas recombinantes se pueden introducir en las células anfitrionas, por ejemplo, mediante transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generan muchas copias de la secuencia del gen. En realizaciones específicas, la transformación de células anfitrionas con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de la proteína aislada, el ADNc o la secuencia de ADN sintetizada permite la generación de copias múltiples del gen. De este modo, se puede obtener el gen en grandes cantidades cultivando transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado. En tales ejemplos, se utiliza un vector adecuado para la expresión de alto nivel. Los vectores ilustrativos se describen a continuación. Los polipéptidos se pueden expresar utilizando cultivos celulares convencionales y otros sistemas de expresión conocidos en la técnica. Las proteínas pueden ser purificadas.

1. Aislamiento o preparación de polipéptidos que codifican ácido nucleico

a. Enzima de degradación de hialuronano

En la presente memoria se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las enzimas de degradación de hialuronano descritas en la presente memoria, tales como las descritas en la Sección C anterior. Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos de PH20 solubles que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158. Como se describió anteriormente, el ADN que codifica una enzima de degradación de hialuronano se puede producir sintéticamente o se puede aislar fácilmente utilizando procedimientos convencionales. Se puede utilizar cualquier método disponible en la técnica para obtener un ADNc completo (es decir, que abarca toda la región codificante), o clon de ADN genómico, que codifica una hialuronidasa, tal como a partir de una célula o fuente de tejido. Las hialuronidasas modificadas, tales como las truncadas o las variantes solubles, se pueden modificar a partir de un polipéptido de tipo salvaje utilizando técnicas de ADN recombinante, incluyendo la mutagénesis dirigida al sitio.

La molécula de ácido nucleico se puede insertar en un vector para su expresión. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados de los plásmidos pCMV4, pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ilustrado en la presente memoria. Otros vectores ilustrativos se describen a continuación.

b. Inhibidores de puntos de control inmunitario (p. ej., Anticuerpos)

En la presente memoria se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los inhibidores de puntos de control inmunitario descritos en la presente memoria, tales como los descritos en la Sección C anterior. Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan las moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1, tal como cualquiera de los descritos en la Sección C anterior. Como se describió anteriormente, las moléculas de ácido nucleico y las proteínas proporcionadas en la presente memoria se pueden preparar mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. Tales procedimientos son rutinarios y son bien conocidos por el experto en la técnica. Incluyen técnicas de biología molecular de rutina que incluyen técnicas de síntesis de genes, PCR, ligación, clonación, transfección y purificación.

Los anticuerpos anti-proteínas de puntos de control inmunitario, tales como los anticuerpos anti-CTLA4 o anti-PD-1, se pueden generar o expresar como anticuerpos completos o como anticuerpos de longitud inferior, incluyendo, pero no limitados a, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como, por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', bisagra de Fab, F(ab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), tándem de scFv, Fv, dsFv, bisagra de scFv, diacuerpo de bisagra de scFv (ΔE), Fd y Fd'. En general, un fragmento de anticuerpo contiene una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de un anticuerpo, tal como cualquiera de los descritos en la presente memoria.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar por hidrólisis proteolítica de anticuerpos intactos (véanse

p. ej., Morimoto et al. (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117; Brennan et al. (1985) Science, 229:81). Por ejemplo, se pueden generar fragmentos de moléculas de anticuerpo por escisión enzimática, tal como por escisión con pepsina o papaína utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, tras la escisión con la proteasa papaína, un dímero de las regiones constantes de la cadena pesada, el dominio Fc, se escinde de las dos regiones Fab (es decir, las porciones que contienen las regiones variables).

Los fragmentos también pueden ser producidos directamente por células anfitrionas recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv se pueden expresar y secretar todos a partir de las células anfitrionas, tales como *E. coli*, facilitando así la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Además, los fragmentos Fab'-SH se pueden acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al. (1992) Bio/Technology, 10: 163-167). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células anfitrionas recombinantes. En algunos ejemplos, el anticuerpo es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) (véanse, p. ej., la Publicación de Patente Internacional Núm. WO93/16185; y las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.571.894 y 5.587.458). Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por lo tanto, son adecuados para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un scFv. El fragmento de anticuerpo también puede ser un anticuerpo lineal (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.641.870). Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Un experto en la técnica conoce otros mecanismos para la producción de fragmentos de anticuerpos.

En algunos ejemplos, el anticuerpo en las combinaciones proporcionadas, y las combinaciones para su uso, es un anticuerpo de cadena sencilla. Se puede generar un anticuerpo de cadena sencilla a partir del dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Los métodos para generar anticuerpos de cadena sencilla utilizando mecanismos recombinantes son conocidos en la técnica, tales como los descritos, por ejemplo, por Marasco et al. (1993) Proc. Natl Acad Sci. USA 90: 7889-7893; Whitlow y Filpula (1991) Methods, 2: 97-105; Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; Pack et al. (1993) Bio/Technology 11: 1271-77; y las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.946.778, 5.840.300, 5.667.988 y 5.658.727.

Los anticuerpos de cadena sencilla se pueden diseñar de forma recombinante uniendo una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L) de un anticuerpo específico. Las secuencias particulares de ácido nucleico para las regiones variables se pueden clonar mediante métodos convencionales de la biología molecular, tales como, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras tecnologías de recombinación de ácidos nucleicos. Los métodos para producir scFv son descritos, por ejemplo, por Whitlow y Filpula (1991) Methods; 2:97-105; Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Pack et al. (1993) Bio/Technology 11:1271-77; y Patentes de Estados Unidos Núm. 4.946.778, 5.840.300, 5.667.988, 5.658.727 y 5.258.498.

Los anticuerpos incluidos en las combinaciones y combinaciones para su uso en la presente memoria pueden ser humanizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son anticuerpos quiméricos diseñados genéticamente o fragmentos de anticuerpos que tienen porciones mínimas derivadas de anticuerpos no humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor) se reemplazan por residuos de una región determinante de la complementariedad de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tienen la funcionalidad deseada. En algunos casos, los residuos del marco Fv del anticuerpo humano se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden contener residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la región determinante de la complementariedad importada ni en las secuencias marco. En general, el anticuerpo humanizado contiene sustancialmente todos los al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas, o sustancialmente todas, las regiones determinantes de la complementariedad corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas, o sustancialmente todas, las regiones marco corresponden a las de una secuencia consenso humana relevante. Los anticuerpos humanizados también pueden incluir al menos una porción de una región constante del anticuerpo, tal como una región Fc, típicamente derivada de un anticuerpo humano (véanse, por ejemplo, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329.; Presta, 1992, Curr. Op. Struct Biol. 2:593-596).

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, el anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos, a menudo denominados residuos importados, se toman típicamente de un dominio variable importado. La humanización se puede realizar sustituyendo las regiones determinantes de la complementariedad humanas, por ejemplo, por las correspondientes regiones determinantes de la complementariedad de roedores (véanse, por ejemplo, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-15361; Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567). Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser típicamente anticuerpos humanos en los que

algunos residuos de la región determinante de la complementariedad y posiblemente algunos residuos del marco están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

También se conocen métodos para identificar anticuerpos frente a una diana, tal como una proteína de puntos de control inmunitario. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden identificar utilizando diversos mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo las bibliotecas de presentación en fagos (véanse, por ejemplo, Hoogenboom & Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Cole et al., 1985, en: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77; Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147:86-95). Además, los anticuerpos se pueden generar a través de uno de varios métodos que emplean la inducción de la producción *in vivo* de moléculas de anticuerpos, escrutinio de bibliotecas de inmunoglobulinas (Orlandi. et al., 1989, Proc. Natl Acad Sci. 86:3833-3837; Winter et al., 1991, Nature 349:293-299) o generación de moléculas de anticuerpos monoclonales por líneas celulares en cultivo. Estos incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de células B humanas y la técnica de hibridoma del virus de Epstein-Barr (EBV) (Kohler et al., 1975, Nature 256:495-497; Kozbor et al., 1985, J. Immunol. Métodos 81:31-42; Cote et al., 1983, Proc. Natl Acad Sci. USA 80:2026-2030; Cole et al., 1984, Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

Las secuencias de ácido nucleico de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de un anticuerpo o fragmento del mismo, tales como cualquiera de las descritas en la presente memoria, se pueden insertar en vectores para la expresión de anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica las secuencias de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de Ipilimumab (SEQ ID NO: 22 y 24, respectivamente) o las secuencias de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de cualquier anticuerpo descrito en la presente memoria se pueden insertar en un vector de expresión descrito en la presente memoria o conocido por un experto en la técnica. La totalidad o una porción de la región constante de la cadena pesada o ligera también se pueden insertar o pueden estar contenidas en el vector para la expresión de anticuerpos IgG o fragmentos de los mismos. Además, las secuencias V_H-C_H1 y V_L-C_L se pueden insertar en un vector de expresión adecuado para la expresión de moléculas Fab. Los dominios de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de un anticuerpo se pueden expresar en un vector de expresión adecuado, tal como un vector que codifica un conector entre la cadena pesada variable y la cadena ligera variable para producir anticuerpos de cadena sencilla. Los conectores ilustrativos incluyen los conectores flexibles ricos en glicina (-G₄S-)_n, donde n es un número entero positivo, tal como 1 (SEQ ID NO: 37), 2 (SEQ ID NO: 38), 3 (SEQ ID NO: 39), 4 (SEQ ID NO: 40), 5 (SEQ ID NO: 41), o más.

2. Vectores

Para la expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, tales como cualquier polipéptido de la enzima de degradación de hialuronano o inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario) descrito en la presente memoria, el ácido nucleico que contiene toda o una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína se puede insertar en un vector de expresión apropiado. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína también está generalmente acoplada a una secuencia señal nativa o heteróloga. Los vectores se pueden seleccionar para la expresión de la proteína enzimática en la célula o de tal manera que la proteína se exprese como una proteína secretada.

La selección de vectores puede depender de la aplicación deseada. Muchos vectores de expresión se encuentran disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. La elección de un vector de expresión está influenciada por la elección del sistema de expresión del anfitrión. Tal selección está dentro del nivel de habilidad del experto en la técnica. El vector contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la proteína insertada. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y, opcionalmente, potenciadores, señales de traducción y señales de terminación de la transcripción y de la traducción. Las señales de transcripción y traducción necesarias también pueden ser suministradas por el promotor nativo para los genes de las enzimas y/o sus regiones flanqueantes.

Los vectores de expresión que se utilizan para la transformación estable suelen tener un marcador seleccionable que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, se puede utilizar un origen de replicación para amplificar el número de copias de los vectores en las células. Los vectores también pueden contener secuencias de nucleótidos adicionales operablemente unidas a la molécula de ácido nucleico ligada (p. ej., etiqueta His, etiqueta Flag). Para aplicaciones con anticuerpos, los vectores generalmente incluyen secuencias que codifican la región constante. Por lo tanto, los anticuerpos o porciones de los mismos también se pueden expresar como fusiones de proteínas. Se puede generar una proteína de fusión para añadir funcionalidad adicional a un polipéptido. Los ejemplos de proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia señal, una etiqueta epitópica utilizada para la detección o visualización (p. ej., una etiqueta His₆ o una etiqueta myc), o una etiqueta para la purificación (p. ej., una fusión de GST), y una secuencia para dirigir la secreción de la proteína y/o la asociación con la membrana.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de anfitrión-vector para expresar la secuencia codificante de la proteína.

Estos incluyen, pero no se limitan a, sistemas celulares de mamífero infectados con virus (p. ej., virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas celulares de insectos infectados con virus (p. ej., baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Los elementos de expresión de los vectores varían en sus fortalezas y especificidades. Dependiendo del sistema de anfitrión-vector utilizado, se puede utilizar cualquiera de los numerosos elementos de transcripción y traducción adecuados.

Se puede utilizar 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 contengan un gen quimérico que contenga señales de control de la transcripción/traducción y secuencias codificantes de proteínas apropiadas. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante y sintéticas *in vitro* y técnicas recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de las mismas, se puede regular mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de la misma se expresen en un anfitrión transformado con la molécula o moléculas de ADN recombinante.

Por ejemplo, la expresión de las proteínas se puede controlar por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. Los promotores bacterianos adecuados son bien conocidos en la técnica, e incluyen promotores para células de mamífero, células de levadura y células de insecto, tales como los promotores ilustrados a continuación. La selección del promotor utilizado para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación particular. En una realización específica, el promotor no es nativo con respecto a los genes para una proteína deseada. Los promotores que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, aquellos para su uso en vectores de expresión eucarióticos, tales como el promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus de sarcoma de Rous (Yamamoto et al. Cell 22:787-797 (1980)), el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner y otros, 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)); en vectores de expresión procarióticos, tales como el promotor de la β -lactamasa (Jay et al., (1981) Proc. Natl Acad Sci. USA 78:5543) o el promotor *tac* (DeBoer et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 80:21-25 (1983); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242:74-94 (1980); vectores de expresión de plantas, tales como el promotor de la nopalina sintetasa (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 fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., Nature 310:115-120 (1984)); elementos promotores de levadura y otros hongos, tales como el promotor Gal4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la fosfoglicerol quinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control de la transcripción animal que muestran especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: región de control del gen de la elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., Cell 38:639-646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987)); la región de control del gen de la insulina que es activa en las células beta pancreáticas (Hanahan et al., Nature 315:115-122 (1985)), la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en las células linfoides (Grosschedl et al., Cell 38:647-658 (1984); Adams et al., Nature 318:533-538 (1985); Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder et al., Cell 45:485-495 (1986)), la región de control del gen de la albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al., Genes y Devel. 1:268-276 (1987)), la región de control del gen de la alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., Mol. Célula. Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235:53-58 (1987)), la región de control del gen 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 la beta-globina que es activa en las células mieloides (Magram et al., Nature 315:338-340 (1985); Kollias et al., Cell 46:89-94 (1986)), la región de control del gen de la proteína básica de la mielina que es activa en los oligodendrocitos del cerebro (Readhead et al., Cell 48:703-712 (1987)), la región de control del gen de la 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 los gonadotrofos del hipotálamo (Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986)).

Además del promotor, el vector de expresión típicamente contiene una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión de la proteína en las células anfitrionas. Un casete de expresión típico contiene un promotor unido operablemente a la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína y las señales requeridas para una poliadenilación eficaz del transcrito, los sitios de unión al ribosoma y la terminación de la traducción. Los elementos adicionales del casete pueden incluir potenciadores. Además, el casete contiene típicamente una región de terminación de la transcripción aguas abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. La región de terminación se puede obtener del mismo gen que la secuencia promotora o se puede obtener de diferentes genes.

Algunos sistemas de expresión tienen marcadores que proporcionan amplificación de genes, tales como la timidina quinasa y la dihidrofolato reductasa. Alternativamente, también son adecuados sistemas de expresión de alto

rendimiento que no implican amplificación génica, tal como el uso de un vector de baculovirus en células de insecto, con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína bajo la dirección del promotor del poliedro u otro promotor de baculovirus fuerte. En una realización específica, se utiliza un vector que contiene un promotor unido operablemente a los ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo del mismo, uno o más orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (p. ej., un gen de resistencia a antibiótico).

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

Los vectores de expresión ilustrativos incluyen cualquier vector de expresión de mamífero tal como, por ejemplo, pCMV. Para la expresión bacteriana, tales vectores incluyen pBR322, pUC, pSKF, pET23D y vectores de fusión tales como MBP, GST y LacZ. Se pueden utilizar otros vectores eucarióticos, por ejemplo, cualquiera que contenga elementos reguladores de virus eucarióticos, como vectores de expresión eucarióticos. Estos incluyen, por ejemplo, vectores SV40, vectores de virus de papiloma y vectores derivados del virus de Epstein-Bar. Los vectores eucarióticos ilustrativos incluyen pMSG, pAV009/A +, pMT010/A +, pMAMneo-5, baculovirus pDSCE, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor de CMV, el promotor temprano de SV40, el promotor tardío de SV40, el promotor de metalotioneína, el promotor del virus tumoral mamario murino, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor del poliedro u otros promotores que se ha demostrado que son eficaces para la expresión en eucariotas.

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

Los vectores de plásmidos ilustrativos para la transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles en Qiagen, Valencia, CA; consúltese también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor del fago T5 (reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión del operador lac doble para proporcionar una expresión estrechamente regulada de alto nivel de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión ribosomal sintético (RBS II) para una traducción eficaz, una secuencia codificante de la etiqueta 6XHis, terminadores de la transcripción t_0 y T1, un origen de replicación de ColE1 y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de una etiqueta 6xHis en el extremo N o C 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 en 6xHis en el extremo N terminal. Otros vectores plasmídicos ilustrativos para la transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la Patente de Estados Unidos 4.952.496; disponible en Novagen, Madison, WI; véase, también la bibliografía publicada por Novagen describiendo el sistema). Tales plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, el terminador T7, el operador lac de *E. coli* inducible, y el gen represor lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, el terminador T7 y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (Novagen, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-Tag™ para su uso en la purificación con una columna His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna, la región promotora T7-lac y el terminador T7.

Se puede utilizar 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 ácido nucleico que codifica una proteína o una cadena de anticuerpo. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante y sintéticas *in vitro* y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La inserción en un vector de clonación se puede lograr, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene extremos cohesivos complementarios. Si los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN se pueden modificar enzimáticamente. Alternativamente, se puede producir cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (conectores) en los extremos del ADN; estos conectores ligados pueden contener ácidos nucleicos sintetizados químicamente específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción.

Para la expresión de anticuerpos, generalmente, el ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo

se clona en un vector y el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de un anticuerpo se clona en un vector. Los genes se pueden clonar en un solo vector para la expresión dual de los mismos, o en vectores separados. En un ejemplo, el ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo se liga en un primer vector de expresión y el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de un anticuerpo se liga en un segundo vector de expresión. Los vectores de expresión pueden ser iguales o diferentes, aunque en general son suficientemente compatibles para permitir la expresión comparable de proteínas (cadena pesada y ligera) de los mismos. Si se desea, los vectores también pueden contener secuencias adicionales que codifican regiones constantes o regiones bisagra adicionales para generar otras formas de anticuerpos. Los vectores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, pY1HC y pKLC (Tiller et al. (2008) J Immunol. Methods, 329:112-24). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión de cadena ligera pAG4622 y el vector de expresión de cadena pesada pAH4604 (Coloma et al. (1992) J Immunol. Methods, 152: 89-104). El vector pAG4622 contiene la secuencia genómica que codifica el dominio de la región C de la cadena κ L humana y el marcador seleccionable gpt. Los vectores pAH4604 contienen el marcador seleccionable hisD y las secuencias que codifican el dominio de la región C γ 1 de la cadena H humana. En otro ejemplo, las cadenas pesada y ligera se pueden clonar en un solo vector que tiene casetes de expresión tanto para la cadena pesada como para la ligera.

3. Células y expresión

En general, cualquier tipo de célula que se pueda diseñar para expresar ADN heterólogo y tenga una vía secretora es adecuada para la expresión de proteínas. Tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo métodos *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas deseadas se pueden expresar en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas requeridas de las proteínas, tales como, por ejemplo, las cantidades y/o formas necesarias para la administración y el tratamiento.

Los anfitriones de expresión incluyen organismos procarióticos y eucarióticos tales como células bacterianas (p. ej., *E. coli*), levadura, células fúngicas, Archaea, células vegetales, células de insectos, células de mamíferos, incluyendo líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los anfitriones de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas, así como en los tipos de modificaciones postraduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. Adicionalmente, la elección del anfitrión de expresión a menudo está relacionada con la elección del vector y los elementos de transcripción y traducción utilizados. Por ejemplo, la elección del anfitrión de expresión depende a menudo, pero no siempre, de la elección de la secuencia precursora utilizada. Por ejemplo, muchas secuencias de señal heterólogas solo se pueden expresar en una célula anfitriona de la misma especie (es decir, una secuencia de señal de célula de insecto se expresa de manera óptima en una célula de insecto). Por el contrario, otras secuencias de señal se pueden utilizar en anfitriones heterólogos tales como, por ejemplo, la secuencia de señal de albúmina de suero humana (hHSA) que funciona bien en células anfitrionas de levaduras, insectos o mamíferos y la secuencia pre/pro del activador de plasminógeno tisular que se ha demostrado que es funcional en células de insectos y mamíferos (Tan et al., (2002) Protein Eng. 15:337). La elección del anfitrión de expresión se puede realizar en función de estos y otros factores, tales como las consideraciones reglamentarias y de seguridad, los costes de producción y la necesidad y los métodos de purificación. Por lo tanto, el sistema vector debe ser compatible con la célula anfitriona utilizada.

Se proporcionan células procarióticas y eucarióticas que contienen los vectores. Tales células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, Archaea, células vegetales, células de insectos y células animales. Las células se utilizan para producir una proteína de la misma haciendo crecer las células descritas anteriormente en condiciones en las que la proteína codificada es expresada por la célula y recuperando la proteína expresada. Por ejemplo, la proteína puede ser secretada al medio.

La expresión en anfitriones eucarióticas puede incluir la expresión en levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, células de insectos tales como células de *Drosophila* y células de *lepidóptero*, plantas y células vegetales tales como tabaco, maíz, arroz, algas y Lemna. Las células eucarióticas para la expresión también incluyen líneas de células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón de cría de hámster (BHK). Los anfitriones de expresión eucarióticos también incluyen la producción en animales transgénicos, por ejemplo, incluyendo la producción en suero, leche y huevos. La expresión eucariótica, tales como los sistemas de expresión de mamíferos, se emplea generalmente cuando se desea la glicosilación de una proteína, tal como para expresar o producir una enzima de degradación de hialuronano glicosilada (p. ej., hialuronidasa soluble, tal como PH20).

Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de proteínas, tales como anticuerpos reensamblados o porciones de los mismos, y son particularmente deseados en aplicaciones de expresión y purificación de proteínas. La transformación en *E. coli* es un mecanismo simple y rápido bien conocido por los expertos en la técnica. Las cepas anfitrionas de *E. coli* I para la expresión de alto rendimiento incluyen, pero no se limitan a, BL21 (EMD Biosciences) y LMG194 (ATCC). Una cepa anfitriona de *E. coli* ilustrativa es BL21. Los vectores para expresión de alto rendimiento incluyen, pero no se limitan a, vectores pBR322 y pUC.

Las moléculas recombinantes se pueden introducir en las células anfitrionas mediante, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generan muchas copias de la secuencia del gen. Por ejemplo, los vectores pueden ser transfectados y expresados en células anfitrionas. En general, los métodos de transfección convencionales se utilizan para producir líneas celulares de bacterias, mamíferos, levaduras o insectos que expresan una gran cantidad de cadenas de anticuerpos, que a continuación se purifican utilizando técnicas convencionales (véase p. ej., Colley et al. (1989) J. Biol. Chem., 264:17619-17622; Guide to Protein Purification, en Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed.), 1990).

La transformación de células eucarióticas y procarióticas se realiza de acuerdo con técnicas convencionales (véanse, p. ej., Morrison (1977) J. Bact. 132:349-351; Clark-Curtiss y Curtiss (1983) Methods in Enzymology, 101, 347-362). Por ejemplo, se puede utilizar cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos foráneas en las células anfitrionas. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, biolística, liposomas, microinyección, vectores de plasma, vectores virales y cualquier otro método bien conocido para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético foráneo en una célula anfitriona.

Generalmente, con el propósito de expresar un anticuerpo, las células anfitrionas se transfectan con un primer vector que codifica al menos una cadena V_H y un segundo vector que codifica al menos una cadena V_L . Por lo tanto, solo es necesario que el procedimiento de ingeniería genética particular utilizado sea capaz de introducir satisfactoriamente al menos ambos genes en la célula anfitriona capaz de expresar el polipéptido del anticuerpo, o su forma modificada. Los primeros y segundos vectores de expresión generalmente se cotransfectan en células anfitrionas, típicamente en una proporción de 1:1. La expresión puede estar en cualquier sistema de expresión celular conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, las células anfitrionas incluyen células que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos en las células anfitrionas recombinantes. Por ejemplo, las células anfitrionas incluyen, pero no se limitan a, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células 293FS, células HEK293-6E, células NSO u otras células de mieloma. Otros vectores de expresión y células anfitrionas se describen en la presente memoria.

Tras la expresión, las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se emparejan mediante un enlace disulfuro para formar un anticuerpo completo o fragmentos del mismo. Por ejemplo, para la expresión de una Ig completa, se pueden clonar las secuencias que codifican V_H - C_H1 -bisagra- C_H2 - C_H3 en un primer vector de expresión y se pueden clonar las secuencias que codifican los dominios V_L - C_L en un segundo vector de expresión. Tras la coexpresión del primer vector de expresión, que codifica los dominios V_H - C_H1 -bisagra- C_H2 - C_H3 , y el segundo vector de expresión, que codifica los dominios V_L - C_L , se expresa un anticuerpo completo. En otro ejemplo, para generar un Fab, las secuencias que codifican V_H - C_H1 se pueden clonar en un primer vector de expresión y las secuencias que codifican los dominios V_L - C_L se pueden clonar en un segundo vector de expresión. Se generan los pares de cadenas pesadas con una cadena ligera y un monómero Fab. Las secuencias de C_H1 , bisagra, C_H2 y/o C_H3 de varios subtipos de IgG son conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., la Publicación de Estados Unidos Núm. 20080248028). Del mismo modo, las secuencias de C_L , lambda o kappa, también son conocidas (véase, p. ej., la Publicación de Estados Unidos Núm. 20080248028). En la presente memoria se proporcionan ejemplos de tales secuencias.

a. Células procarióticas

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

Las proteínas, tales como las que se proporcionan en la presente memoria, se pueden expresar en el entorno citoplásmico de *E. coli*. El citoplasma es un entorno reductor y para algunas moléculas, esto puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Se pueden utilizar agentes reductores tales como el ditiotreitól y el β -mercaptoetanol y desnaturalizantes, tales como guanidina-HCl y la urea, para volver a solubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de las bacterias, que proporciona un entorno oxidante e isomerazas de tipo chaperonina y disulfuro y puede conducir a la producción de proteínas solubles. Normalmente, una secuencia líder se fusiona con la proteína que se va a expresar, la cual dirige la proteína al periplasma. Después, el líder se elimina mediante peptidasas señal dentro del periplasma.

Los ejemplos de secuencias líder dirigidas a periplasma incluyen el líder pelB del gen de la pectato liasa y el líder derivado del gen de la fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la filtración de la proteína expresada al medio de cultivo. La secreción de proteínas permite una purificación rápida y sencilla del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no se secretan se pueden obtener del periplasma por lisis osmótica. De in modo similar a la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y se pueden

utilizar desnaturalizantes y agentes reductores para facilitar la solubilización y el replegamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y solubilidad, típicamente se utilizan temperaturas entre 25°C y 37°C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por lo tanto, si las proteínas requieren glicosilación para funcionar, se puede añadir glicosilación *in vitro* después de la purificación de las células anfitrionas.

b. Células de levadura

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

c. Células de insectos

Las células de insecto, particularmente utilizando la expresión en baculovirus, son útiles para expresar proteínas. Las células de insectos expresan altos niveles de proteína y son capaces de la mayoría de las modificaciones post-traduccionales utilizadas por los eucariotas superiores. Los baculovirus tienen una gama de anfitriones restrictiva que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones reguladoras de la expresión eucariótica. Los vectores de expresión típicos utilizan un promotor para la expresión de alto nivel, tales como el promotor de la polihedrina y p10 de baculovirus. Los sistemas de baculovirus utilizados comúnmente incluyen los baculovirus tales como el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), y el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea celular de insecto tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para la expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que se va a expresar se fusiona inmediatamente aguas abajo del codón de inicio de la polihedrina del virus. Para generar recombinantes de baculovirus capaces de expresar anticuerpos humanos, se puede utilizar una transferencia de expresión dual, tal como pAcUW51 (PharMingen). Las señales de secreción de mamíferos se procesan con precisión en células de insecto y se pueden utilizar para secretar la proteína expresada al medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas celulares de mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto consiste en la utilización de células transformadas de manera estable. Las líneas celulares tales como las células Schneider 2 (S2) y Kc (*Drosophila melanogaster*) y las células C7 (*Aedes albopictus*) se pueden utilizar para la expresión. El promotor de metalotioneína de *Drosophila* se puede utilizar para inducir altos niveles de expresión en presencia de inducción de metales pesados con cadmio o cobre. Además, se pueden utilizar las líneas celulares tales como las células Sf9 derivadas de *Spodoptera frugiperda* y las células derivadas TN de *Trichoplusia ni* para la expresión. El promotor del gen temprano inmediato de baculovirus IE1 se puede utilizar para inducir niveles consistentes de expresión. Los vectores de expresión típicos incluyen los vectores de transferencia pIE1-3 y pI31-4 (Novagen). Los vectores de expresión se mantienen típicamente mediante el uso de marcadores seleccionables tales como neomicina e higromicina.

d. Células de mamífero

Se pueden utilizar sistemas de expresión de mamífero para expresar proteínas. Los constructos de expresión se pueden transferir a células de mamíferos por infección viral tal como adenovirus o por transferencia directa de ADN tal como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamíferos incluyen típicamente una protección terminal de ARNm, una caja TATA, una secuencia de inicio de la traducción (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. También se pueden agregar elementos IRES para permitir la expresión bicistónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Tales vectores a menudo incluyen promotores-potenciadores de la transcripción para la expresión de alto nivel, por ejemplo, el promotor-potenciador de SV40, el promotor de citomegalovirus

humano (CMV) y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores-potenciadores están activos en muchos tipos de células. Los promotores de tipo tisular y celular y las regiones potenciadoras también se pueden utilizar para la expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, aquellas de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón, albúmina, alfa fetoproteína, alfa 1 antitripsina, beta globina, proteína básica de mielina, cadena ligera 2 de miosina, y el control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica.

Los marcadores seleccionables se pueden utilizar para seleccionar y mantener las células con la construcción de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, aminoglucósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Por ejemplo, la expresión se puede realizar en presencia de metotrexato para seleccionar solo aquellas células que expresan el gen DHFR. Para la expresión de anticuerpos, se puede utilizar un sistema NEO^R/G418, un sistema de dihidrofolato reductasa (DHFR) o un sistema de glutamina sintetasa (GS). El sistema GS usa vectores de expresión conjunta, tales como pEE12/pEE6, para expresar tanto la cadena pesada como la ligera. La fusión con moléculas de señalización de la superficie celular tales como TCR-γ y FcεRI-γ puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo sobre la superficie celular.

Se encuentran disponibles muchas líneas celulares para la expresión de mamíferos, incluyendo células de ratón, rata, ser humano, mono, pollo y hámster. Las líneas celulares ilustrativas incluyen, pero no se limitan 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 se encuentran disponibles líneas celulares adaptadas a medios libres de suero que facilitan la purificación de proteínas secretadas de los medios de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, Núm. de catálogo 11619-012) y la línea celular EBNA-1 sin suero (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-342). También están disponibles líneas celulares que están adaptadas para crecer en medios especiales optimizados para la máxima expresión. Por ejemplo, las células CHO DG44 están adaptadas para crecer en cultivo en suspensión en un medio sin productos químicos, definido químicamente.

e. Plantas

Se pueden utilizar células de plantas transgénicas y plantas para expresar proteínas tales como cualquiera de las descritas en la presente memoria. Las construcciones de expresión se transfieren típicamente a las plantas utilizando la transferencia directa de ADN, tal como el bombardeo con microproyectiles y la transferencia mediada por PEG a protoplastos, y con la transformación mediada por *Agrobacterium*. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación de la transcripción y elementos de control de la traducción.

Los vectores de expresión y las técnicas de transformación generalmente se dividen entre anfitriones dicotiledóneos, tales como *Arabidopsis* y tabaco, y monocotiledóneos, tales como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores de plantas utilizados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintetasa, el promotor de la ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de la ubiquitina y UBQ3.

A menudo se utilizan marcadores seleccionables tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa para facilitar la selección y el mantenimiento de las células transformadas. Las células vegetales transformadas se pueden mantener en cultivo como células, productos agregados (tejido de callo) o regeneradas en plantas completas. Las células de plantas transgénicas también pueden incluir algas diseñadas para producir proteínas. Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de la proteína producida en estos anfitriones.

4. Técnicas de purificación

El método para la purificación de proteínas a partir de células anfitrionas dependerá de las células anfitrionas y de los sistemas de expresión elegidos. Para las moléculas secretadas, las proteínas generalmente se purifican de los medios de cultivo después de eliminar las células. Para la expresión intracelular, las células se pueden lisar y las proteínas se pueden purificar a partir del extracto. Cuando se utilizan para la expresión, organismos transgénicos, tales como plantas y animales transgénicos, se pueden utilizar tejidos u órganos como material de partida para obtener un extracto de células lisadas. Además, la producción animal transgénica puede incluir la producción de polipéptidos en la leche o los huevos, que se pueden recolectar, y si es necesario, las proteínas se pueden extraer y purificar adicionalmente utilizando métodos convencionales de la técnica.

Cuando las proteínas son expresadas por bacterias transformadas en grandes cantidades, típicamente después de la inducción del promotor, aunque la expresión puede ser constitutiva, los polipéptidos pueden formar productos agregados insolubles. Existen varios protocolos que son adecuados para la purificación de cuerpos de inclusión de polipéptidos conocidos por los expertos en la técnica. Numerosas variaciones serán evidentes para los expertos en

la técnica.

Por ejemplo, en un método, la suspensión celular generalmente se centrifuga y el sedimento que contiene los cuerpos de inclusión se resuspende en un tampón que no se disuelve sino que lava los cuerpos de inclusión. p. ej., Tris-HCl 20 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM y Triton-X 100 al 2%, un detergente no iónico. Puede ser necesario repetir la etapa de lavado para eliminar la mayor cantidad posible de residuos celulares. El sedimento restante de cuerpos de inclusión se puede resuspender en un tampón apropiado (p. ej., fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM). Otros tampones apropiados son evidentes para los expertos en la técnica.

Alternativamente, las proteínas pueden ser purificadas a partir de periplasma de bacterias. Cuando la proteína se exporta al periplasma de las bacterias, la fracción periplásmica de las bacterias se puede aislar por choque osmótico frío además de otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en un método, para aislar polipéptidos recombinantes del periplasma, las células bacterianas se centrifugan para formar un sedimento. El sedimento se puede resuspender en un tampón adecuado que contiene sacarosa al 20%. Para lisar las células, las bacterias se pueden centrifugar y el sedimento se puede resuspender en MgSO_4 5 mM enfriado con hielo y mantener en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión celular se centrifuga y el sobrenadante se decanta y se guarda. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante se pueden separar de las proteínas anfitrionas mediante mecanismos de separación convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los mecanismos de separación descritos en la presente memoria. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, las siguientes etapas: fraccionamiento de solubilidad, filtración diferencial por tamaño y cromatografía en columna.

Las proteínas se pueden purificar utilizando mecanismos convencionales de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, SDS-PAGE, cromatografía de fraccionamiento por tamaño y de exclusión por tamaño, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como cromatografía de intercambio aniónico. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de purificación por afinidad para mejorar la eficacia y la pureza de las preparaciones. Por ejemplo, los anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a las enzimas hialuronidasas se pueden utilizar en la purificación por afinidad. Las construcciones de expresión también se pueden diseñar para añadir una etiqueta de afinidad a una proteína tal como un epítipo myc, una fusión GST o His₆ y se pueden purificar por afinidad con anticuerpo contra myc, resina de glutatión y resina de Ni, respectivamente. Tales etiquetas pueden ayudar en los métodos de purificación por afinidad.

Las técnicas de purificación por afinidad también se pueden utilizar para la purificación de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-proteína de puntos de control inmunitario proporcionados en la presente memoria se pueden purificar mediante el uso de cromatografía en columna, en donde un material de columna de soporte sólido está ligado a la Proteína G, una proteína asociada a la superficie celular de *Streptococcus*, que une inmunoglobulinas con alta afinidad. En otros ejemplos, los anticuerpos anti-proteína de puntos de control inmunitario se pueden purificar por cromatografía en columna, en donde un material de columna de soporte sólido está ligado a la Proteína A, una proteína asociada a la superficie celular de *Staphylococcus* que se une a las inmunoglobulinas, tales como los anticuerpos IgG, con alta afinidad (véase, p. ej., Liu et al. (2010) MAb 2 (5):480-499). Otras proteínas bacterianas de unión a inmunoglobulina que se pueden utilizar para purificar los anticuerpos anti-proteína de puntos de control inmunitario que se proporcionan en la presente memoria incluyen la Proteína A/G, una proteína de fusión recombinante que combina los dominios de unión a IgG de la Proteína A y la Proteína G; y la Proteína L, una proteína de superficie de *Peptostreptococcus* (Bjorck (1988) J. Immunol., 140 (4):1194-1197; Kastern, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267 (18):12820-12825; Eliasson et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:4323-4327).

La pureza se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la electroforesis en gel y las técnicas de tinción y espectrofotometría. Las proteínas se pueden purificar a 60%, 70%, 80% de pureza y típicamente al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de pureza. La pureza se puede evaluar mediante métodos convencionales tales como SDS-PAGE y tinción con Coomassie. Una vez que se obtienen las proteínas adecuadas, se puede someter a prueba su actividad. Por ejemplo, un anticuerpo se puede someter a prueba para determinar la actividad de unión mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como, pero no limitado a, ELISA, transferencia Western o resonancia de plasmón superficial. Una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble o PH20 se puede analizar para determinar la actividad de la hialuronidasa. Una enzima de degradación de hialuronano purificada tiene típicamente una actividad específica de al menos 70.000 a 100.000 Unidades/mg, por ejemplo, aproximadamente 120.000 Unidades/mg. La actividad específica puede variar tras la modificación, tal como con un polímero. Por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero, tal como una hialuronidasa soluble conjugada con un polímero (p. ej., PEGPH20) puede tener una actividad específica de 25.000 a 60.000 Unidades/mg, por ejemplo, aproximadamente 35.000 Unidades/mg.

5. PEGilación de polipéptidos de enzima de degradación de hialuronano

El polietilenglicol (PEG) se ha utilizado ampliamente en biomateriales, biotecnología y medicina principalmente

porque el PEG es un polímero biocompatible, no tóxico, soluble en agua que generalmente no es inmunogénico (Zhao y Harris, ACS Symposium Series 680:458-72, 1997). En el área del suministro de fármacos, los derivados de PEG se han utilizado ampliamente en el anclaje covalente (es decir, "PEGilación") a proteínas para reducir la inmunogenicidad, la proteólisis y el aclaramiento renal y para aumentar la solubilidad (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16:157-82, 1995). De manera similar, el PEG se ha anclado a fármacos relativamente hidrófobos de bajo peso molecular para mejorar la solubilidad, reducir la toxicidad y alterar la biodistribución. Normalmente, los fármacos PEGilados se inyectan en forma de soluciones.

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

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, mPEG alfa-metilbutanoato de succinimidilo, mPEG propionato de succinimidilo, mPEG butanoato de succinimidilo, mPEG éster succinimidílico de ácido carboximetil 3-hidroxibutanoico, PEG homobifuncional-propionato de succinimidilo, PEG homobifuncional propionaldehído, PEG homobifuncional butiraldehído, PEG maleimida, PEG hidrazida, carbonato de p-nitrofenilo PEG, mPEG-carbonato de benzotriazol, propionaldehído PEG, mPEG butiraldehído, mPEG₂ butiraldehído ramificado, mPEG acetilo, mPEG piperidona, mPEG metilcetona, mPEG maleimida "sin conector", mPEG vinil sulfona, mPEG tiol, mPEG ortopiridiltoéster, mPEG disulfuro de ortopiridilo, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona PEG-NHS, acrilato PEG-NHS, fluoresceína PEG-NHS, y biotina PEG-NHS (véanse p. ej., Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6:62-69, 1995; Veronese et al., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; Patentes de Estados Unidos Núm. 5.672.662; U.S. 5.932.462; U.S. 6.495.659; U.S. 6.737.505; U.S. 4.002.531; U.S. 4.179.337; U.S. 5.122.614; U.S. 5.324.844; U.S. 5.446.090; U.S. 5.612.460; U.S. 5.643.575; U.S. 5.766.581; U.S. 5.795.569; U.S. 5.808.096; U.S. 5.900.461; U.S. 5.919.455; U.S. 5.985.263; U.S. 5.990.237; U.S. 6.113.906; U.S. 6.214.966; U.S. 6.258.351; U.S. 6.340.742; U.S. 6.413.507; U.S. 6.420.339; U.S. 6.437.025; U.S. 6.448.369; U.S. 6.461.802; U.S. 6.828.401; U.S. 6.858.736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; WO0500360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; Patentes Europeas Núm. EP 1064951; EP 0822199; y Publicaciones de Patentes Internacionales Núm. WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

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

Si bien se han descrito numerosas reacciones para la PEGilación, las que son más generalmente aplicables confieren direccionalidad, utilizan condiciones de reacción moderadas y no requieren un extenso procesamiento aguas abajo para eliminar catalizadores o productos biológicos tóxicos. Por ejemplo, el monometoxi PEG (mPEG) tiene solamente un hidroxilo terminal reactivo, y por lo tanto su uso limita algo de la heterogeneidad de la mezcla producto de PEG-proteína resultante. La activación del grupo hidroxilo en el extremo del polímero opuesto al grupo metoxi terminal generalmente es necesaria para lograr una PEGilación de la proteína eficaz, con el objetivo de hacer que el PEG derivatizado sea más susceptible al ataque nucleofílico. El nucleófilo atacante suele ser el grupo épsilon-amino de un residuo de lisilo, pero también pueden reaccionar otras aminas (p. ej., la amina alfa N-terminal o las aminas anulares de la histidina) si las condiciones locales son favorables. Es posible un anclaje más dirigido en proteínas que contienen una sola lisina o cisteína. El último residuo puede ser dirigido por PEG-maleimida para la modificación específica de tiol. Alternativamente, la PEG hidrazida se puede hacer reaccionar con una enzima de degradación de hialuronano oxidada con peryodato y se puede reducir en presencia de NaCNBH₃. Más específicamente, los azúcares de CMP PEGilados se pueden hacer reaccionar con una enzima de degradación de hialuronano en presencia de glicosil-transferasas apropiadas. Una técnica es la técnica de "PEGilación" en la que varias moléculas poliméricas se acoplan al polipéptido en cuestión. Cuando se utiliza esta técnica, el sistema

inmunológico tiene dificultades para reconocer los epítomos sobre la superficie del polipéptido responsable de la formación de anticuerpos, lo que reduce la respuesta inmunitaria. Para los polipéptidos introducidos directamente en el sistema circulatorio del cuerpo humano para producir un efecto fisiológico particular (es decir, productos farmacéuticos) la respuesta inmunitaria potencial típica es una respuesta de IgG y/o IgM, mientras que los polipéptidos que se inhalan a través del sistema respiratorio (es decir, polipéptidos industriales) pueden causar potencialmente una respuesta de IgE (es decir, respuesta alérgica). Una de las teorías que explican la respuesta inmunitaria reducida es que las moléculas poliméricas protegen los epítomos sobre la superficie del polipéptido responsable de la respuesta inmunitaria que conduce a la formación de anticuerpos. Otra teoría o al menos un factor parcial es que cuanto más pesado es el producto conjugado, más se obtiene una respuesta inmunitaria reducida.

Típicamente, para preparar las enzimas de degradación de hialuronano PEGiladas proporcionadas en la presente memoria, incluyendo las hialuronidasas PEGiladas, los radicales de PEG se conjugan, mediante anclaje covalente, a los polipéptidos. Las técnicas para la PEGilación incluyen, pero no se limitan a, conectores y químicas de acoplamiento especializados (véase p. ej., Roberts et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 54:459-476, 2002), el anclaje de múltiples radicales de PEG a un solo sitio de conjugación (tal como a través del uso de PEG ramificados; véase p. ej., Guiotto et al., Bioorg. Medicina. Chem. Lett. 12:177-180, 2002), PEGilación específica del sitio y/o mono-PEGilación (véase p. ej., Chapman et al., Nature Biotech. 17:780-783, 1999), y PEGilación enzimática dirigida al sitio (véase p. ej., Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 54:487-504, 2002). Los métodos y mecanismos descritos en la técnica pueden producir proteínas que tengan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 PEG o derivados de PEG anclados a una única molécula de proteína (véase p. ej., la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2006/0104968).

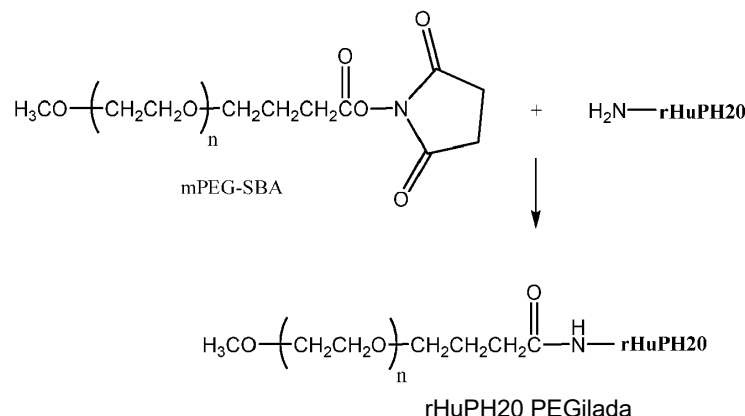
Como ejemplo ilustrativo de la PEGilación de un método ilustrativo para preparar enzimas de degradación de hialuronano PEGiladas, tales como hialuronidasas PEGiladas, se han aplicado aldehídos, succinimidas y carbonatos de PEG, a los radicales de PEG conjugados, típicamente succinimidil PEG, a rHuPH20. Por ejemplo, rHuPH20 se ha conjugado con reactivos de succinimidil monoPEG (mPEG) ilustrativos incluyendo mPEG-propionatos de succinimidilo (mPEG-SPA), mPEG-butanoatos de succinimidilo (mPEG-SBA), y (para el anclaje de PEG "ramificados") mPEG2-N-hidroxisuccinimida. Estos ésteres de succinimidilo PEGilados contienen cadenas principales de carbono de longitud diferente entre el grupo PEG y el entrecruzador activado, y un grupo PEG simple o ramificado. Estas diferencias se pueden utilizar, por ejemplo, para proporcionar diferentes cinéticas de reacción y para restringir potencialmente los sitios disponibles para el anclaje de PEG a rHuPH20 durante el proceso de conjugación.

Los succinimidil PEG (como anteriormente) que comprenden PEG lineales o ramificados se pueden conjugar con rHuPH20. Los PEG se pueden utilizar para generar de manera reproducible rHuPH20 que contienen moléculas que tienen, como promedio, entre aproximadamente tres y seis o de tres a seis moléculas de PEG por hialuronidasa. Tales composiciones de rHuPH20 PEGiladas se pueden purificar fácilmente para producir composiciones que tienen actividades específicas de aproximadamente 25.000 o 30.000 Unidades/mg de proteína de actividad hialuronidasa, y que están sustancialmente libres de rHuPH20 no PEGilada (menos de 5% no PEGilada).

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

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

Esquema 1



Típicamente, el mPEG-SBA-30K u otro PEG se añade a la enzima de degradación de hialuronano, en algunos casos una hialuronidasa, en una razón molar PEG:polipéptido de 10:1 en un tampón adecuado, p. ej., NaCl 130 mM/HEPES 10 mM a pH 6,8 o tampón fosfato 70 mM, pH 7, seguido de esterilización p. ej., filtración en condiciones estériles y conjugación continua, por ejemplo, con agitación, durante la noche a 4°C en una habitación fría. En un ejemplo, el PEG-enzima de degradación de hialuronano conjugado se concentra y se cambia el tampón.

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

Los métodos para la PEGilación de polipéptidos de degradación de hialuronano, incluyendo, por ejemplo, hialuronidasas derivadas de animales y enzimas de degradación de hialuronano bacterianas, son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente Europea Núm. EP 0400472, que describe la PEGilación de hialuronidasa testicular bovina y condroitina ABC liasa. También, la Publicación de Estados Unidos Núm. 2006014968 describe la PEGilación de una hialuronidasa humana derivada de PH20 humana. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano PEGilada generalmente contiene al menos 3 radicales de PEG por molécula. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano puede tener una razón molar de PEG con respecto a proteína entre 5:1 y 9:1, por ejemplo, 7:1.

E. Composiciones y formulaciones farmacéuticas

En la presente memoria se proporcionan composiciones o combinaciones de un agente anti-hialuronano y un agente inhibidor de puntos de control inmunitario de acuerdo con las presentes reivindicaciones. Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan composiciones o combinaciones de una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y un agente inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como una formulación de anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1. La formulación del agente anti-proteína de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, se puede coformular o coadministrar con composiciones que contienen un agente anti-hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano. Típicamente, el agente anti-hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, se puede proporcionar como una combinación de composiciones separadas que se administran por separado, por ejemplo, para la administración previa de la enzima de degradación de hialuronano como se describe en la presente memoria. Las composiciones o combinación de composiciones se pueden formular para el suministro parenteral (es decir, para el suministro sistémico). Por ejemplo, las composiciones o combinación de composiciones se formulan para el suministro subcutáneo o para el suministro intravenoso.

Las composiciones y combinaciones se pueden formular para la administración de dosificaciones únicas o para la administración de dosificaciones múltiples. Los agentes se pueden formular para administración directa. Las

composiciones se pueden proporcionar como una formulación líquida o liofilizada.

Los compuestos se pueden formular en preparaciones farmacéuticas adecuadas tales como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elixires, para administración oral, así como preparación de parches transdérmicos e inhaladores de polvo seco. Típicamente, los compuestos se formulan en composiciones farmacéuticas utilizando mecanismos y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase p. ej., Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta edición, 1985, 126). En general, el modo de formulación es una función de la vía de administración. Las composiciones se pueden coformular o proporcionar en forma de composiciones separadas.

En general, las composiciones se formulan en forma liofilizada o líquida. Cuando las composiciones se proporcionan en forma liofilizada, se pueden reconstituir justo antes de su uso por medio un tampón apropiado, por ejemplo, una solución salina estéril. Las composiciones se pueden proporcionar juntas o por separado. Para los fines de la presente memoria, tales composiciones típicamente se proporcionan por separado. El agente anti-hialuronano, por ejemplo, la enzima de degradación del hialuronano (p. ej., una hialuronidasa soluble, tal como una PH20) y un agente anti-proteína de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, se pueden empaquetar como composiciones separadas para la administración conjunta, secuencial o intermitente. Las combinaciones se pueden empaquetar en forma de un kit.

Las composiciones se pueden formular para la administración por cualquier vía conocida por los expertos en la técnica, incluyendo la inyección intramuscular, intravenosa, intradérmica, intralesional, intraperitoneal, la administración subcutánea, intratumoral, epidural, nasal, oral, vaginal, rectal, tópica, local, ótica, inhaladora bucal (p. ej., sublingual), y transdérmica o cualquier vía. También se contemplan otros modos de administración. La administración puede ser local, tópica o sistémica, dependiendo del lugar del tratamiento. La administración local en una zona que necesita tratamiento se puede lograr, por ejemplo, pero no se limita a, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, p. ej., junto con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de. Las composiciones también se pueden administrar con otros agentes biológicamente activos, ya sea de forma secuencial, intermitente o en la misma composición. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada que incluyen formulaciones de liberación controlada y liberación controlada del dispositivo, por ejemplo, mediante una bomba.

La ruta más adecuada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores, tales como la naturaleza, el progreso y la gravedad del cáncer que se está tratando y de la composición particular que se utiliza. Para los fines de la presente memoria, se desea que un agente anti-hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano (p. ej., una hialuronidasa soluble, como una PH20) y un agente anti-proteína de puntos de control inmunitario (p. ej., anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario) se administran de manera tal que exista una cantidad o nivel farmacéuticamente disponible en el plasma. Por ejemplo, las composiciones se administran sistémicamente, por ejemplo, mediante administración intravenosa. También se pueden emplear métodos subcutáneos, aunque pueden ser necesarios tiempos de absorción más largos para asegurar una biodisponibilidad equivalente en comparación con los métodos intravenosos. Los agentes, tales como una enzima de degradación de hialuronano y un agente anti-proteína de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1, se pueden administrar por diferentes vías de administración. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

Se pueden emplear métodos de administración para disminuir la exposición de las enzimas de degradación de hialuronano. p. ej., hialuronidasas solubles y otras moléculas a procesos degradativos, tales como la degradación proteolítica y la intervención inmunológica a través de respuestas antigénicas e inmunogénicas. Los ejemplos de tales métodos incluyen la administración local en el sitio de tratamiento o la infusión continua del agente anti-hialurónico.

1. Formulaciones

Las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan a tenor de las aprobaciones de una agencia reguladora u otra agencia preparada de acuerdo con una farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y en seres humanos. Las composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Una composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales, tales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y otros agentes similares. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra una enzima o activador. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen 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 para proporcionar la forma de administración apropiada al paciente. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los derivados del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo.

El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un ingrediente activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábica, gelatina, glucosa, melaza, polivinilpirrolidina, celulosa y derivados de las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes 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 en polvo desnatada, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, sal de sodio de acetato de trietanolamina, oleato de trietanolamina y otros agentes similares.

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

Los compuestos farmacéuticamente y terapéuticamente activos y los derivados del mismo se formulan y administran típicamente en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiples. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador farmacéutico, vehículo o diluyente requerido. Las formas de dosificación unitaria, incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles y soluciones o suspensiones orales, y emulsiones de agua y aceite que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las formas de dosis unitarias pueden estar contenidas en ampollas y jeringas o se pueden envasar individualmente en comprimidos o cápsulas. Las formas de dosis unitarias se pueden administrar en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosis unitarias idénticas empaquetadas en un solo recipiente para ser administradas en forma de dosis unitaria segregada. Los ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de 0,57 litros o 4,55 litros. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no se segregan en el envase. En general, se pueden preparar formas de dosificación o composiciones que contengan ingrediente activo en el intervalo de 0,005% a 100% estando constituido el resto por un portador no tóxico.

La composición farmacéutica se puede formular en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

a. Inyectables, soluciones y emulsiones.

En la presente memoria se contempla la administración parenteral, generalmente caracterizada por la inyección, por vía subcutánea, intramuscular, intratumoral, intravenosa o intradérmica. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas que se van a administrar también pueden contener un activador en forma de un disolvente tal como agentes tamponadores del pH, sales de iones metálicos u otros tampones similares. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otras cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad y otros agentes similares, tales como por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. La implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de manera que se mantenga un nivel constante de dosificación (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 3.710.795) también se contempla en la presente memoria. El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones parenterales es altamente dependiente de la naturaleza específica del mismo, así como de la actividad del compuesto y de las necesidades del sujeto.

Los inyectables están diseñados para la administración local y sistémica. Para los fines de la presente memoria, la administración local se desea para la administración directa al intersticio afectado asociado con hialuronano en

exceso o acumulado. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para ser combinados con un disolvente justo antes de su uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para ser combinados con un vehículo justo antes de su uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas. Si se administran por vía intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen la inyección de cloruro de sodio, la inyección de Ringers, la inyección de dextrosa isotónica, la inyección de agua estéril, la inyección de Ringers con dextrosa y lactato añadidos. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijados de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Se pueden añadir agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales envasadas en contenedores de dosis múltiples, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido metil y propil 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 carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen Polisorbato 80 (TWEEN 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles con agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajustar el pH.

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

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

b. Polvos liofilizados

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria incluyen polvos liofilizados, que se pueden reconstituir para su administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. También se pueden reconstituir y formularse como sólidos o geles. Los polvos liofilizados se pueden preparar a partir de cualquiera de las soluciones descritas anteriormente.

El polvo liofilizado, estéril se prepara disolviendo un compuesto de un agente anti-hialuronano que es una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, y/o un agente anti-proteína de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1) en una solución tampón. La solución tampón puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparado a partir del polvo. La posterior filtración en condiciones estériles de la solución seguida de liofilización en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la materia proporciona la formulación deseada. Brevemente, 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 similar conocido por los expertos en la técnica. A continuación, se añade una enzima seleccionada a la mezcla resultante y se agita hasta que se disuelve. La mezcla resultante se filtra en condiciones estériles o se trata para eliminar los productos particulados y asegurar la esterilidad, y se distribuye en viales para la liofilización. Cada vial contendrá una dosis única (1 mg - 1 g, generalmente 1-100 mg, tal como 1-5 mg) o dosis múltiples del compuesto. El polvo liofilizado se puede almacenar en condiciones apropiadas, tal como de aproximadamente 4°C a temperatura ambiente.

La reconstitución de este polvo liofilizado con una solución tampón proporciona una formulación para su uso en la administración parenteral. La cantidad precisa depende de la indicación tratada y del compuesto seleccionado. Tal cantidad puede ser determinada empíricamente.

c. Composiciones para otras vías de administración

- Dependiendo de la afección tratada, también se contemplan en la presente memoria otras vías de administración, tales como aplicación tópica, parches transdérmicos, administración oral y rectal. Por ejemplo, las mezclas tópicas se preparan como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsiones o similares y se formulan como cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendas, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para administración tópica.
- Los compuestos se pueden formular para aplicación local o tópica, tal como para la aplicación tópica en la piel y las membranas mucosas, tal como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y para la aplicación en el ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. Se contempla la administración tópica para suministro transdérmico y también para administración en los ojos o la mucosa, o para terapias de inhalación. También se pueden administrar soluciones nasales del compuesto activo solo o combinado con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.
- Se proporcionan formulaciones adecuadas para la administración transdérmica. Se pueden proporcionar en cualquier formato adecuado, tal como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Tales parches contienen el compuesto activo en una solución acuosa opcionalmente tamponada, por ejemplo, a una concentración de 0,1 a 0,2 M con respecto al compuesto activo. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica también se pueden administrar por iontoforesis (véase, p. ej., Pharmaceutical Research 3 (6), 318 (1986)) y típicamente adoptan la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada del compuesto activo.
- Las formas de dosificación farmacéutica para administración rectal son supositorios rectales, cápsulas y comprimidos para el efecto sistémico. Los supositorios rectales incluyen cuerpos sólidos para la inserción en el recto que se funden o ablandan a la temperatura corporal, liberando uno o más ingredientes farmacológicamente o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, Carbowax (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono, di y triglicéridos de ácidos grasos. Se pueden utilizar combinaciones de las diversas bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales se pueden preparar por el método de compresión por moldeo. El peso típico de un supositorio rectal es de aproximadamente 2 a 3 g. Las formulaciones adecuadas para administración rectal se pueden proporcionar en forma de supositorios de dosis unitaria. Estos se pueden preparar mezclando el compuesto activo con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y a continuación moldeando la mezcla resultante. Los comprimidos y cápsulas para administración rectal se fabrican utilizando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y mediante los mismos métodos que para las formulaciones para administración oral.
- Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar, por ejemplo, la forma de comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p. ej., almidón de patata o sal de sodio de glicolato de almidón); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir mediante métodos bien conocidos en la técnica.
- Las formulaciones adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen, por ejemplo, píldoras que contienen el compuesto activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; y pastillas que contienen el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.
- Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar mediante formulaciones de liberación controlada y/o dispositivos de suministro (véase, p. ej., en las Patentes de Estados Unidos Núm. 3.536.809; 3.598.123; 3.630.200; 3.845.770; 3.847.770; 3.916.899; 4.008.719; 4.687.660; 4.769.027; 5.059.595; 5.073.543; 5.120.548; 5.354.556; 5.591.767; 5.639.476; 5.674.533 y 5.733.566).
- Se conocen diversos sistemas de suministro y se pueden utilizar para administrar composiciones seleccionadas, tales como la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptores y suministro de moléculas de ácido nucleico que codifican una hialuronidasa soluble u otro agente tales como los sistemas de suministro de retrovirus.
- Por lo tanto, en ciertas realizaciones, también se pueden emplear liposomas y/o nanopartículas con la administración de composiciones de la presente invención. Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. La sonicación de las MLV da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en

el intervalo de 200 a 500 angstrom que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras distintas de los liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la razón molar de lípido con respecto a agua. A bajas proporciones, 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 una baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas se someten a una transición de fase que altera notablemente su permeabilidad. La transición de fase implica un cambio de una estructura ordenada y estrechamente empaquetada, conocida como estado de gel, a una estructura menos ordenada y empaquetada, conocida como estado fluido. Esto ocurre a una temperatura de transición de fase característica y da como resultado un aumento de la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Los liposomas interactúan con las células a través de diferentes mecanismos: endocitosis por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial, tales como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, ya sea por fuerzas hidrófobas o electrostáticas débiles no específicas, o por interacciones específicas con componentes de la superficie celular; fusión con la membrana celular plasmática mediante la inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea de contenidos liposomales en el citoplasma; y por transferencia de lípidos liposomales a membranas celulares o subcelulares, o viceversa, sin ninguna asociación de los contenidos de los liposomas. La variación de la formulación del liposoma puede alterar qué mecanismo es operativo, aunque pueden operar más de uno al mismo tiempo. Las nanocápsulas generalmente pueden atrapar compuestos de manera estable y reproducible. Para evitar los efectos secundarios debidos a la sobrecarga de polímeros intracelulares, estas partículas ultrafinas (con un tamaño aproximado de 0,1 μm) se deben diseñar utilizando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Las nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente memoria, y tales partículas pueden fabricarse fácilmente.

2. Cantidades de formulación

Las composiciones se pueden formular para la administración de dosificación única o para la administración de dosificaciones múltiples. En algunos ejemplos, los agentes están formulados para la administración directa.

a. Formulaciones de enzimas de degradación de hialuronano

En las composiciones o combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente memoria en donde el agente anti-hialuronano es una enzima de degradación de hialuronano tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se formula en una cantidad para administración directa en un intervalo entre o aproximadamente entre 0,5 μg a 50 mg, tal como de 100 μg a 1 mg, de 1 mg a 20 mg, de 100 μg a 5 mg, de 0,5 μg a 1.450 μg , de 1 μg a 1.000 μg , de 5 μg a 1.250 μg , de 10 μg a 750 μg , de 50 μg a 500 μg , de 0,5 μg a 500 μg o de 500 μg a 1.450 μg . Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se formula en una cantidad para administración directa en un intervalo entre o aproximadamente entre 15 Unidades (U) o 150 Unidades (U) a 60.000 Unidades por dosis, de 300 U a 30.000 U, de 500 U a 25.000 U, de 500 U a 10.000 U, de 150 U a 15.000 U, de 150 U a 5.000 U, de 500 U a 1.000 U, de 5000 U a 45.000 U, de 10.000 U a 50.000 U o de 20.000 U a 60.000 U, por ejemplo al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente o 15 U, 50 U, 100 U, 200 U, 300 U; 400 U; 500 U; 600 U; 700 U; 800 U; 900 U; 1.000 U; 1.250 U; 1.500 U; 2.000 U; 3.000 U; 4.000 U; 5.000 U; 6.000 U; 7.000 U; 8.000 U; 9.000 U; 10.000 U; 20.000 U; 30.000 U; 40.000 U; o 50.000 U.

La enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero en la composición se puede proporcionar a una concentración de entre o aproximadamente entre 10 U/mL a 15.000 U/mL, de 10 U/mL a 5.000 U/mL, de 10 U/mL a 2.000 U/mL, de 10 U/mL a 1.000 U/mL, de 10 U/mL a 600 U/mL, de 10 U/mL a 500 U/mL, de 30 U/mL a 3.000 U/mL, de 30 U/mL a 1.000 U/mL, de 50 U/mL a 4.000 U/mL, de 100 U/mL a 2.000 U/mL, de 100 U/mL a 1.000 U/mL, de 300 U/mL a 2.000 U/mL, de 600 U/mL a 2.000 U/mL, de 600 U/mL a 1.000 U/mL, de 1.000 U/mL a 15.000 U/mL, de 100 U/mL a 5.000 U/mL, de 500 U/mL a 5.000 U/mL o de 100 U/mL a 400 U/mL, por ejemplo al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente o 30 U/mL, 35 U/mL, 40 U/mL, 50 U/mL, 100 U/mL, 150 U/mL, 200 U/mL, 300 U/mL, 400 U/mL, 500 U/mL, 600 U/mL, 700 U/mL, 800 U/mL, 900 U/mL, 1.000 U/mL, 2.000 Unidades/mL, 3.000 U/mL, 4.000 U/mL, 5.000 U/mL, 6.000 U/mL, 7.000 U/mL, 8.000 U/mL, 9.000 U/mL, 10.000 U/mL, 11.000 U/mL, 12.000 U/mL o 12.800 U/mL.

La enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se puede proporcionar a una concentración que está entre o aproximadamente entre 0,1 $\mu\text{g/mL}$ y 10 mg/mL, tal como de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 5 mg/mL o de 1 mg/mL a 5 mg/mL. En algunos ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero en la composición se puede proporcionar a una concentración de entre o aproximadamente entre 0,1 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$, de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ a 50 $\mu\text{g/mL}$, de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ a 20 $\mu\text{g/mL}$, de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$, de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 50 $\mu\text{g/mL}$, de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 20 $\mu\text{g/mL}$, de 20 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$, de 20 $\mu\text{g/mL}$ a 50 $\mu\text{g/mL}$ o de 50 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$, por ejemplo al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 70 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 90 $\mu\text{g/mL}$ o 100 $\mu\text{g/mL}$.

El volumen de la composición puede ser de 0,5 mL a 1.000 mL, tal como de 0,5 mL a 100 mL, de 0,5 mL a 10 mL, de 1 mL a 500 mL, de 1 mL a 10 mL, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL o más. La composición generalmente se formula de modo que la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero no se administre en volúmenes superiores a aproximadamente 50 mL, y típicamente se administre en un volumen de 5 a 30 mL, generalmente en un volumen que no sea superior a aproximadamente 10 mL. Para volúmenes más grandes, el tiempo de infusión se puede adaptar para facilitar el suministro del volumen más grande. Por ejemplo, el tiempo de infusión puede ser de al menos 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora o más.

Por ejemplo, una formulación estabilizada convencional de una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como una hialuronidasa soluble conjugada con polímero como se proporciona en la presente memoria, se formula con uno o más de EDTA, NaCl, CaCl_2 , histidina, lactosa, albúmina, Pluronic® F68, TWEEN® y/u otros detergentes u otros agentes similares. Por ejemplo, las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden contener uno o más tamponadores de pH (tales como, por ejemplo, histidina, fosfato u otros tampones), o un tampón ácido (tal como acetato, citrato, piruvato, Gly-HCl, succinato, lactato, maleato, u otros tampones), modificador de la tonicidad (tal como, por ejemplo, un aminoácido, polialcohol, NaCl, trehalosa, otras sales y/o azúcares), estabilizador, agente quelante, tal como etilendiaminotetraacetato (EDTA) o EDTA de calcio (CaEDTA), captador de oxígeno, tal como metionina, ácido ascórbico/ascorbato, ácido cítrico/citrato o albúmina y/o un conservante, tal como un conservante que contiene un anillo aromático (p. ej., fenol o cresol).

Los estabilizadores ilustrativos que son útiles para las composiciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano incluyen detergentes, tales como polisorbatos y proteínas tales como albúmina de suero humano. Las concentraciones ilustrativas de albúmina sérica que son útiles en las composiciones de la presente memoria incluyen de 0,1 mg/mL a 1 mg/mL, tal como al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,9 mg/mL o 1 mg/mL, pero puede ser más o menos.

Los polisorbatos también pueden estar presentes en las composiciones, por ejemplo, a concentraciones de o aproximadamente entre 0,001% y 0,1%, tales como al menos aproximadamente o al menos o aproximadamente 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005%, 0,006%, 0,007%, 0,008%, 0,009%, 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09% o 0,1%.

También puede estar presente un agente quelante de metales, tal como el EDTA de calcio (CaEDTA), tal como por ejemplo, a concentraciones de aproximadamente 0,02 mM a 20 mM, tal como al menos aproximadamente o al menos o aproximadamente 0,02 mM, 0,04 mM, 0,06 mM, 0,08 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM o más.

El pH y la osmolaridad de las composiciones pueden ser ajustados por un experto en la técnica para optimizar las condiciones para la actividad y estabilidad deseadas de la composición. En algunos ejemplos, las composiciones proporcionadas en la presente memoria tienen una osmolaridad entre 100 mOsm/kg y 500 mOsm/kg, tal como al menos o al menos aproximadamente o tienen o tienen aproximadamente 100 mOsm/kg, 120 mOsm/kg, 140 mOsm/kg, 160 mOsm/kg, 180 mOsm/kg, 200 mOsm/kg, 220 mOsm/kg, 240 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 300 mOsm/kg, 320 mOsm/kg, 340 mOsm/kg, 360 mOsm/kg, 380 mOsm/kg, 400 mOsm/kg, 420 mOsm/kg, 440 mOsm/kg, 460 mOsm/kg, 500 o más mOsm/kg, y un pH entre o entre aproximadamente 6 y 8, tal como de 6 a 7,4, por ejemplo en o aproximadamente 6, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 u 8.

En general, el NaCl se proporciona en formulaciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano en la presente memoria, por ejemplo, en una cantidad que es o es de aproximadamente 100 mM a 150 mM o más. Por ejemplo, una formulación ilustrativa puede contener o contener aproximadamente histidina 10 mM y/o contener o contener aproximadamente NaCl 130 mM. Otras formulaciones pueden contener además o alternativamente lactosa, por ejemplo, a o aproximadamente 13 mg/mL. Además, en la formulación puede estar presente un agente antibacteriano o antifúngico, que incluye, pero no se limitan a, tiomersal. Las formulaciones pueden además contener albúmina, Pluronic® F68, TWEEN® y/u otro detergente. Las formulaciones se proporcionan a un pH que es o es aproximadamente de 6,0 a 7,4, tal como al menos 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 o 7,4, en general, eso es o es aproximadamente pH 6,5. Las formulaciones concentradas de una hialuronidasa soluble modificada para su uso en la presente memoria generalmente se diluyen en una solución salina u otra solución tamponada con sal antes de la administración para mantener la concentración de sal apropiada.

b. Formulaciones de inhibidores de puntos de control

En las composiciones o combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente memoria, el inhibidor de puntos de control inmunitario se formula en una cantidad para administración directa en un intervalo entre o entre aproximadamente 7,5 mg y aproximadamente 5,000 mg, de aproximadamente 7,5 mg a aproximadamente 1.500

mg, de aproximadamente 7,5 mg a aproximadamente 750 mg, o de aproximadamente 22,5 a aproximadamente 750 mg. En algunos ejemplos, el inhibidor de puntos de control inmunitario se puede formular como una formulación de dosis baja, por ejemplo, para una administración más frecuente. En tales formulaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario se formula para la administración de dosificación única en una cantidad que es menor o menor de aproximadamente 1 mg, 500 µg, 400 µg, 300 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg, 30 µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg o menos de 1 µg. Por lo tanto, las cantidades no limitantes de inhibidor de puntos de control inmunitario que se formulan para la administración directa incluyen una dosificación que es o es aproximadamente 1 µg 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 250 µg, 500 µg, 1 mg, 5 mg, 7,5 mg, 10 mg, 20 mg, 22,5 mg, 30 mg, 35 mg, 37,5 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 210 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 375 mg, 500 mg, 750 mg, 1.000 mg, 1.500 mg, 2.000 mg, 2.500 mg, 3.000 mg, 3.500 mg, 4.000 mg, 4.500 mg, o 5.000 mg.

Las formulaciones que contienen un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, se pueden proporcionar como porcentaje de peso por volumen. Tales concentraciones de un inhibidor de puntos de control inmunitario incluyen, pero no se limitan a, una concentración que es o es aproximadamente de 0,01% a 99,5% p/v, tal como de 0,1% a 90% p/v, de 0,1% a 70% p/v, de 0,1% a 30% p/v, o de 5% a 22% p/v. En ejemplos, el inhibidor de puntos de control inmunitario en las composiciones se puede proporcionar a una concentración que está entre o aproximadamente entre 0,5 mg/mL y 500 mg/mL, tal como de 0,5 mg/mL a 250 mg/mL, de 0,5 mg/mL a 100 mg/mL, de 0,5 mg/mL a 50 mg/mL, de 0,5 mg/mL a 10 mg/mL, de 0,5 mg/mL a 6 mg/mL, de 0,5 mg/mL a 2 mg/mL, de 2 mg/mL a 250 mg/mL, de 2 mg/mL a 100 mg/mL, de 2 mg/mL a 50 mg/mL, de 2 mg/mL a 10 mg/mL, de 2 mg/mL a 6 mg/mL, de 6 mg/mL a 250 mg/mL, de 6 mg/mL a 100 mg/mL, de 6 mg/mL a 50 mg/mL, de 6 mg/mL a 10 mg/mL, de 10 mg/mL a 250 mg/mL, de 10 mg/mL a 100 mg/mL, de 10 mg/mL a 50 mg/mL, de 50 mg/mL a 250 mg/mL, de 50 mg/mL a 100 mg/mL, o de 100 mg/mL a 250 mg/mL. Por ejemplo, el inhibidor de puntos de control inmunitario se puede proporcionar en la composición a una concentración que sea al menos 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL, 120 mg/mL, 150 mg/mL, 180 mg/mL, 200 mg/mL, 220 mg/mL, 250 mg/mL o más. En algunos casos, el inhibidor de puntos de control inmunitario en la formulación se proporciona en una cantidad que es de al menos 1% (10 mg/mL) a 30% (300 mg/mL), por ejemplo, al menos 1%, 2%, 3 %, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30% o más.

El volumen de la composición puede ser de 0,5 mL a 1.000 mL, tal como de 0,5 mL a 100 mL, de 0,5 mL a 10 mL, de 1 mL a 500 mL, de 1 mL a 10 mL, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL , 70 mL, 80 mL, 90 mL o más. Cuando se administra, la composición se puede administrar por infusión. Para volúmenes más grandes, el tiempo de infusión se puede adaptar para facilitar la administración del volumen más grande. Por ejemplo, el tiempo de infusión puede ser de al menos 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora, 2 horas o más.

Las preparaciones de anticuerpos proporcionadas en la presente memoria se pueden formular como composiciones farmacéuticas para su uso en dosificaciones únicas o múltiples. Típicamente, el anticuerpo se formula en una cantidad tal que está lista para su uso y que no requiere una dilución adicional. Dependiendo de si la formulación se proporciona como una formulación de dosificación única o múltiple, un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad exacta de anticuerpo en la formulación.

Se entiende que las formulaciones de anticuerpo pueden contener otros componentes, incluyendo portadores, polímeros, lípidos y otros excipientes. Las concentraciones de dosificación anteriores son con respecto al componente del anticuerpo, que es el ingrediente activo.

3. Artículos de empaquetamiento y manufactura

También se describen artículos de manufactura que contienen materiales de empaquetamiento, cualquier composición farmacéutica o combinación proporcionada en la presente memoria, y una etiqueta que indica que las composiciones y combinaciones deben utilizarse para el tratamiento de cánceres, tales como los cánceres caracterizados por tumores sólidos que tienen un fenotipo de HA al menos moderado a alto. Los artículos de manufactura ilustrativos son recipientes que incluyen recipientes de cámara única y de cámara doble. Los recipientes incluyen, pero no se limitan a, tubos, frascos y jeringas. Los recipientes pueden incluir además una aguja para administración subcutánea.

En un ejemplo, el artículo de manufactura contiene una composición farmacéutica que contiene el agente anti-hialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y el inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., el anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario), y ningún agente o tratamiento adicional. En otro ejemplo, el artículo de manufactura contiene composiciones farmacéuticas que contienen el agente anti-hialuronano (p. ej., enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como PEGPH20), el inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., el anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario) y una

agente terapéutico adicional (p. ej., un agente quimioterapéutico). En este ejemplo, los agentes se pueden proporcionar juntos o por separado, para el empaquetamiento como artículos de manufactura.

Los artículos de manufactura descritos en la presente memoria contienen materiales de empaquetamiento. Los materiales de empaquetamiento para su uso en el empaquetado de productos farmacéuticos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.252. Los ejemplos de materiales de empaquetamiento farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, envases de tipo burbuja, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, frascos y cualquier material de empaquetado adecuado para una formulación seleccionada y un modo de administración y tratamiento previsto.

La elección del paquete depende de los agentes y de si tales composiciones se empaquetarán juntas o por separado. En general, el empaquetado no es reactivo con las composiciones contenidas en él. En otros ejemplos, algunos de los componentes se pueden empaquetar como una mezcla. En otros ejemplos, todos los componentes se empaquetan por separado. Así, por ejemplo, los componentes se pueden envasar como composiciones separadas que, al mezclarse justo antes de la administración, se pueden administrar directamente juntos. Alternativamente, los componentes se pueden empaquetar como composiciones separadas para su administración por separado.

Los componentes pueden ser empaquetados en un recipiente. Los componentes se empaquetan por separado en el mismo recipiente. En general, los ejemplos de tales recipientes incluyen aquellos que tienen un espacio cerrado y definido que contiene la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, y un espacio separado, cerrado y definido que contiene los otros componentes o componente, de manera que las áreas subsiguientes están separadas por una membrana fácilmente extraíble que, al retirarla, permite que los componentes se mezclen o que permite que los componentes se administren por separado. Se contempla cualquier recipiente u otro artículo de manufactura, siempre que los agentes estén separados de los otros componentes antes de la administración. Para ejemplos adecuados véanse p. ej., los recipientes descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 3.539.794 y 5.171.081.

Las composiciones seleccionadas que incluyen artículos de manufactura de los mismos también se pueden proporcionar en forma de kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y un artículo para la administración proporcionado como un artículo de manufactura. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones de aplicación que incluyan dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para los modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y un artículo para diagnóstico.

F. Métodos de seguimiento y evaluación de la actividad, biodisponibilidad y farmacocinética

Los agentes en las composiciones de la presente memoria se pueden evaluar por sus propiedades y actividades relacionadas con su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. Las propiedades y actividades se pueden relacionar con actividades biológicas, tumorigénicas y/o inmunoresponsables. Los ensayos se pueden realizar *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos se pueden utilizar para evaluar los efectos de los agentes, incluyendo los efectos de la dosis y la vía de administración.

1. Actividad de hialuronidasa

La actividad de la hialuronidasa se puede evaluar utilizando métodos bien conocidos en la técnica. En particular, los ensayos para la hialuronidasa se pueden determinar midiendo la cantidad de ácido hialurónico (hialuronano, HA) que se degrada. Los ensayos pueden incluir métodos viscosimétricos y turbidimétricos (Daubenmerkl et al. (1957) Acta Pharmacol. et Toxicol, 13:1-11). Los ensayos también pueden incluir métodos de ELISA, cromatografía y colorimetría. Tales ensayos son conocidos por un experto en la técnica. Se pueden utilizar el Patrón de Referencia de Hialuronidasa (USP), la Solución de Hialuronidasa Patrón del Formulario Nacional (NF) o el Patrón de referencia de Hialuronidasa Internacional, en el que una unidad de cada una es equivalente, a un ensayo para determinar la actividad, en unidades, de cualquier hialuronidasa.

Un método turbidimétrico para evaluar la actividad de la hialuronidasa puede incluir los procedimientos de ensayo descritos en el Formulario Nacional de la Farmacopea XXIII de los Estados Unidos mediante la medición de la cantidad de ácido hialurónico o hialuronano (HA) no degradado, que queda después de 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).

Por ejemplo, la actividad se puede medir utilizando un ensayo de microturbidez. Este se basa en la formación de un producto precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con la albúmina sérica. La actividad se mide mediante la incubación de hialuronidasa con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un período de tiempo determinado (p. ej., 10 minutos) y a continuación precipitación del hialuronato de sodio no digerido con la adición de

albúmina de suero acidulada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un período de desarrollo adicional. La disminución de la turbidez resultante de la actividad de la hialuronidasa sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática de la hialuronidasa.

En otro ejemplo, la actividad de la hialuronidasa se mide utilizando un ensayo de microtitulación en el que el ácido hialurónico biotinilado residual se mide después de la incubación con hialuronidasa (véase p. ej., Frost y Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20050260186). Los grupos carboxilo libres en los residuos de ácido glucurónico del ácido hialurónico están biotinilados, y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado se acopla covalentemente a una placa de microtitulación. Tras la incubación con hialuronidasa, el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual se detecta utilizando una reacción de avidina-peroxidasa, y se compara con el obtenido después de la reacción con patrones de hialuronidasa de actividad conocida. También se conocen en la técnica otros ensayos para medir la actividad de la hialuronidasa y se pueden utilizar en los métodos de la presente memoria (véase p. ej., Delpech et al., (1995) Anal. Biochem. 229:35-41; Takahashi et al., (2003) Anal. Biochem. 322:257-263).

También se puede evaluar la capacidad de la hialuronidasa para actuar como un agente de dispersión o difusión. Por ejemplo, se puede inyectar colorante azul de tripano por vía subcutánea con o sin hialuronidasa en la piel lateral de cada lado de los ratones atímicos. Después se mide el área del colorante, por ejemplo con un microcalibre, para determinar la capacidad de la hialuronidasa para actuar como un agente de dispersión (Patente de Estados Unidos Núm. 20060104968).

2. Actividad del inhibidor de puntos de control inmunitario

La actividad de un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo, se puede evaluar utilizando métodos conocidos en la técnica, incluyendo métodos *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de un inhibidor de puntos de control para unirse a la molécula de puntos de control diana (p. ej., CTLA4 o PD-1). Se pueden utilizar otros ensayos *in vitro* para evaluar otras actividades biológicas de los inhibidores de puntos de control inmunitario, tales como un anticuerpo. Por ejemplo, se puede evaluar la capacidad de un inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo) para bloquear los puntos de control inmunitarios y, por lo tanto, estimular una respuesta inmunitaria, en células cultivadas, tales como la activación de células T, la expresión de receptores extracelulares o la secreción de citoquinas. Tales actividades se pueden evaluar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, ELISA, transferencia Western, transferencia Northern, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y citometría de flujo para evaluar la expresión del marcador.

En ejemplos particulares, los inhibidores de puntos de control inmunitario, tales como los anticuerpos anti-proteína de puntos de control inmunitario, por ejemplo los anticuerpos anti-CTLA4 o anti-PD-1, se pueden analizar para determinar la capacidad para unirse a su antígeno de proteína de puntos de control inmunitario, tal como CTLA4 o PD-1. Los inhibidores de puntos de control inmunitario, tales como los anticuerpos anti-proteína de puntos de control inmunitario, se pueden evaluar para determinar su capacidad para unirse a una proteína de puntos de control inmunitario por cualquier método conocido por un experto en la materia. Los ensayos para evaluar la unión incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión a un soporte sólido, ensayos de unión en solución o ensayos basados en células. Los ensayos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, resonancia de plasmón superficial; interferometría de bio-cap; inmunoensayos, tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada), Meso Scale Discovery (MSD, Gaithersburg, Maryland), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ELISPOT, reacciones con precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o microscopía inmunoelectrónica; calorimetría de titulación isotérmica (ITC); ensayos espectroscópicos; y otros ensayos para evaluar la unión conocidos por un experto en la técnica.

Se puede evaluar la unión a la proteína de puntos de control inmunitario correspondiente, tal como la unión a CTLA4 o PD-1. Varias de las proteínas de puntos de control inmunitario descritas en la presente memoria son receptores que están unidos a la membrana. Tales proteínas se pueden expresar en forma de una proteína soluble, donde la región unida a la membrana, tal como el dominio transmembrana, de la proteína se modifica o elimina, por ejemplo, mediante escisión proteolítica o por expresión recombinante del ácido nucleico codificante, para eliminar el dominio de asociación a la membrana y hacer que la proteína sea soluble. Las formas solubles ilustrativas de las proteínas de puntos de control inmunitario incluyen péptidos que corresponden al dominio extracelular de la proteína de puntos de control inmunitario, o una porción de la misma que sea soluble y sea reconocida por el inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., el anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario).

Los ensayos de unión se pueden realizar en solución, suspensión o sobre un soporte sólido. Por ejemplo, la proteína de puntos de control inmunitario o un fragmento de la misma se pueden inmovilizar en un soporte sólido (p. ej., una superficie de plástico o carbono, una placa o chip de cultivo de tejidos) y poner en contacto con el inhibidor de

puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo u otro agente de unión. El inhibidor no unido (p. ej., el anticuerpo) o la proteína diana se pueden lavar y a continuación se pueden detectar los complejos unidos. Los ensayos de unión se pueden realizar en condiciones para reducir la unión no específica, por ejemplo, utilizando un tampón de alta fuerza iónica (p. ej., NaCl 0,3-0,4 M) con detergente no iónico (p. ej., Triton X-100 o Tween 20 al 0,1 %) y/o proteínas de bloqueo (p. ej., albúmina de suero bovino o gelatina). También se pueden incluir controles negativos en dichos ensayos como una medida de unión del fondo. Las afinidades de unión se pueden determinar utilizando el análisis de Scatchard (Munson et al., (1980) Anal. Biochem., 107:220), resonancia de plasmón superficial, calorimetría isotérmica, ELISA cuantitativo u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. (p. ej., Liliomet al. (1991) J. Immunol Methods. 143(1):119-25).

En algunos casos, la unión se puede evaluar utilizando células que se sabe que expresan la proteína de puntos de control inmunitario diana (p. ej., CTLA4 o PD-1). Las células pueden ser células, líneas celulares o células primarias generadas por transfección transitoria o estable. Por ejemplo, líneas celulares ilustrativas que expresan CTLA4 que se pueden utilizar en ensayos basados en células para escrutar proteínas de unión a CTLA, tales como anticuerpos anti-CTLA4, incluyendo, pero no limitados a, líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal HCT-8 (ATCC CCL-244), HT-29 (ATCC HTB-38), COLO 205 (ATCC CCL-222) y CACO-2 (ATCC HTB-37); líneas celulares de carcinoma de mama, MCF-7 (ATCC HTB-22), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), T-47D (ATCC HTB-133); líneas celulares de carcinoma de pulmón, CALU-1 (ATCC HTB-54), CALU-6 (ATCC HTB-56), A549 (ATCC CCL-185); la línea celular de carcinoma de ovario, SKOV-3 (ATCC HTB-77); y la línea celular de carcinoma uterino, C33A (ATCC HTB-31). Las líneas celulares ilustrativas que expresan PD-1 que se pueden utilizar en ensayos basados en células para escrutar proteínas inhibidoras de PD-1, tales como los anticuerpos anti-PD-1, incluyen, pero no se limitan a, EL4 (ATCC TIB-39) y células Jurkat (ATCC TIB-152).

La unión se puede evaluar utilizando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. Además de la unión celular, se puede emplear un ensayo para evaluar la actividad funcional del inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., el anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario), incluyendo, pero no limitado a, ensayos para evaluar cambios en la activación de células T, cambios en la morfología celular, y/o cambios en la activación transcripcional, tal como la expresión celular de un gen natural o un gen informador.

Se pueden tratar células determinadas apropiadas para un ensayo fenotípico particular (es decir, cualquier célula descrita en la presente memoria o conocida en la técnica por expresar una proteína de puntos de control inmunitario seleccionada) con un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, así como un control. En algunos ejemplos, la proteína de puntos de control inmunitario diana es un receptor y el ligando, tal como CD80 o CD86 (para CTLA4) o PD-L1 o PD-L2 (para PD-1), se incluye en el ensayo para que se efectúe la activación del receptor. Al final del período de tratamiento, las células tratadas y no tratadas se pueden analizar mediante uno o más métodos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. En algunos ejemplos, se puede evaluar la actividad del inhibidor de puntos de control inmunitario proporcionado en la presente memoria midiendo los cambios en la morfología celular, la proliferación celular o la señalización. Los cambios en la morfología tras la activación de células T son descritos por Wülfing et al., (1998) Proc Natl Acad Sci U S A. 95 (11): 6302-6307.

Los ensayos de proliferación se pueden utilizar para medir la actividad de los inhibidores de puntos de control inmunitario seleccionados, tales como los anticuerpos anti-proteína de puntos de control inmunitario. Los ensayos pueden medir la proliferación de células que expresan una proteína de puntos de control inmunitario seleccionada tras el tratamiento con un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1, en presencia de un ligando, como CD80 o CD86 (para CTLA4) o PD-L1 o PD-L2 (para PD-1). Las células se pueden incubar durante un tiempo suficiente para que las células muestren una proliferación (tal como, por ejemplo, 12 horas o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o más). La proliferación celular se puede medir por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo el ensayo de incorporación de ³H-timidina, 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), ELISA, ensayo de microplaca de tetrazolio y ensayo de fosfatasa ácida (p. ej., Maghni et al. (1999) J. Immunol. Method 223(2):185-194). La proliferación celular también se puede medir utilizando los kits disponibles de Invitrogen (kit de ensayo de proliferación de células Cyquant NF), Cambrex (ViaLight HS (alta sensibilidad) BioAssay), Promega (Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo, Guava Technologies (ensayo CellGrowth), Stratagene (Ensayo de proliferación celular Quantos (p. ej., Ensayos para Estudios de Proliferación Celular, *Genetic Eng. Biotechnol. News* 26(6)). En algunos ejemplos, la proliferación celular se puede normalizar a la proliferación de células sin el inhibidor de puntos de control inmunitario. En ensayos de proliferación ilustrativos, se pueden agregar células a un pocillo de una placa de 96 pocillos en un medio de crecimiento normal que incluya el inhibidor de puntos de control inmunitario que se vaya a analizar.

El inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como los anticuerpos anti-proteína de puntos de control inmunitario, por ejemplo, los anticuerpos anti-CTLA4 o anti-PD-1, se pueden marcar para que la actividad de unión se pueda evaluar y determinar. Por ejemplo, para detectar la unión, el inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como los anticuerpos anti-CTLA4 o anti-PD-1, se puede marcar con un radical o etiqueta detectable para facilitar la detección.

El experto en la técnica puede seleccionar un radical o etiqueta detectables apropiados para las condiciones del ensayo. Por ejemplo, algunos reactivos secundarios, tales como los anticuerpos anti-Ig, no se pueden utilizar para detectar la unión de una proteína modificada que es un anticuerpo en una solución que contiene suero humano. Además, no se puede utilizar un anticuerpo anti-IgG para detectar la unión de una biomolécula que es un anticuerpo.

Se puede utilizar cualquier radical detectable u otro radical conocido por un experto en la técnica que sea susceptible de ser detectado o identificado. El radical o la etiqueta se pueden ligar a la molécula de prueba, tal como una proteína terapéutica o un anticuerpo, directa o indirectamente, por ejemplo, utilizando un conector. La unión puede estar en el extremo N o C del anticuerpo terapéutico. Las etiquetas y los radicales ilustrativos que se pueden utilizar, incluyen pero no se limitan a, cualquiera de los expuestos en la Tabla 5.

Tabla 5. Etiquetas y radicales ilustrativos

Nombre	Secuencia	Núm. de residuos	Tamaño (Da)	SEQ ID NO
c-Myc	EQKLISEEDL	10	1.200	19
FLAG	DYKDDDDK	8	1.012	20
His	HHHHHHH	6		31
HA	YPYDVPDYA	9	1.102	32
VSV-G	YTDIEMNRLGK	11	1.339	42
HSV	QPELAPEDPED	11	1.239	43
V5	GKPIPNNLLGLDST	14	1.421	44
Poli Arg	RRRRR	5-6	800	45
Strep-tag-II	WSHPQFEK	8	1.200	46
S	KETAAKFERQHMD	15	1.750	47
3x FLAG	DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	22	2.730	48
HAT	KDHLIHNHVHKEFHAAHNK	19	2.310	49
SBP	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP	38	4.306	50

Se puede utilizar cualquier conector conocido por un experto en la técnica que sea capaz de ligar el radical detectable a los anticuerpos terapéuticos descritos en la presente memoria. Los conectores ilustrativos incluyen los conectores flexibles ricos en glicina ($-G_4S-$)_n, donde n es un número entero positivo, tal como 1 (SEQ ID NO: 37), 2 (SEQ ID NO: 38), 3 (SEQ ID NO: 39), 4 (SEQ ID NO: 40), 5 (SEQ ID NO: 41), o más.

3. Actividad anticancerosa de la terapia combinada

Los sujetos humanos o no humanos o los modelos de tumores animales se pueden utilizar para determinar la eficacia del tratamiento combinado, realizando un seguimiento del tumor, la salud general del sujeto y/o el curso de la enfermedad en el sujeto. Se puede incluir cualquiera de una variedad de etapas de seguimiento para evaluar la eficacia de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria, incluyendo, pero no limitadas a, seguimiento del tamaño del tumor, seguimiento del título de anticuerpos anti-(antígeno tumoral), seguimiento de la presencia y/o el tamaño de las metástasis, seguimiento de los ganglios linfáticos del sujeto, y seguimiento del peso del sujeto u otros indicadores de salud incluyendo marcadores de sangre u orina.

Además, se puede evaluar la respuesta inmunitaria después de la administración de las combinaciones proporcionadas. Las combinaciones proporcionadas en la presente memoria activan una respuesta inmunitaria al inhibir las proteínas de puntos de control inmunitario. La activación de una respuesta inmunitaria provoca actividades clínicas que son distintas de las respuestas clínicas de las terapias citotóxicas que se utilizan tradicionalmente para tratar los cánceres. Por ejemplo, se espera observar las respuestas clínicas, tales como una disminución en el tamaño del tumor o un retraso en el crecimiento del tumor, a las terapias citotóxicas en las primeras semanas de tratamiento. En contraste, los sujetos a los que se les administraron tratamientos que activaban el sistema inmunológico para tratar un tumor podían mostrar una respuesta tardía, a continuación de un crecimiento estable o incluso progresivo del tumor en las primeras semanas o meses después del tratamiento. Los inhibidores de puntos de control inmunitario también pueden provocar una respuesta antitumoral que dure un período prolongado después de la interrupción del tratamiento. Por ejemplo, las respuestas duraderas después de la inhibición de una proteína de puntos de control inmunitario se pueden medir en meses o años, incluso después de la interrupción del tratamiento.

Se pueden realizar estudios *in vivo* con modelos animales o sujetos humanos o no humanos para evaluar la actividad terapéutica de las enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímeros, tales como PEGPH20, y los inhibidores de puntos de control inmunitario, tales como los anticuerpos anti-proteína de puntos de control inmunitario, tales como los anticuerpos anti-CTLA4 o anti-PD-1, como se describe en la presente memoria, individualmente y/o combinados. En ejemplos particulares, se evalúa la actividad combinatoria de la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p. ej., PEGPH20), y el inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., anti-CTLA4 o anti-PD-1). Como se describe en otra parte de la presente memoria, típicamente los agentes se administran por separado, por lo que la enzima de degradación de hialuronano (p. ej., la enzima de degradación de hialuronano PEGilada, tal como una hialuronidasa soluble PEGilada), se administra antes del inhibidor de puntos de control inmunitario.

En algunos ejemplos, se utilizan modelos de cáncer animal para evaluar el tratamiento combinado de una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como PEGPH20, y un inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1). Tales usos de modelos animales se pueden utilizar para predecir la eficacia del tratamiento combinado en pacientes con cáncer, evaluando la activación de la respuesta inmunitaria y/o midiendo la inhibición de la formación de tumores, la regresión tumoral o la metástasis después de la administración de las combinaciones proporcionadas. Tales modelos animales también se pueden utilizar para evaluar los efectos secundarios de los anticuerpos de terapias combinadas proporcionados en la presente memoria.

En ejemplos particulares, se evalúa la eficacia terapéutica de la terapia combinada para tratar tumores que se caracterizan por tener un contenido de HA moderado a alto. p. ej., tumores HA^{alto} (o HA+3). Los métodos para determinar y clasificar el contenido de HA de un tumor se describen en la Sección H. Se pueden seleccionar los sujetos humanos para el tratamiento y se puede evaluar o hacer un seguimiento de la eficacia terapéutica de la terapia combinada. En otros casos, se pueden generar modelos animales (p. ej., modelos de xenoinjerto o aloinjerto de ratón) que tienen un tumor HA^{alto}. En algunos ejemplos, las células que se inyectan en el ratón para generar el modelo de cáncer de ratón están diseñadas para producir altos niveles de hialuronano, de manera que el tumor generado por la línea celular es un tumor HA^{alto}. Tales líneas celulares se pueden establecer mediante la introducción estable de uno o más genes exógenos que codifican una o más enzimas hialuronano sintasas, tales como la hialuronano sintasa 1 (HAS1; expuesta en SEQ ID NO: 51), la hialuronano sintetasa 2 (HAS2; expuesta en SEQ ID NO: 52), o la hialuronano sintasa 3 (HAS3; expuesta en SEQ ID NO: 2).

a. Crecimiento y volumen del tumor

Se pueden utilizar sujetos humanos o no humanos o modelos de tumores animales para determinar la eficacia del tratamiento combinado, midiendo la inhibición de la formación de tumores, la regresión del tumor o la metástasis después de la administración de las combinaciones proporcionadas. Tales efectos pueden incluir el seguimiento del crecimiento y el volumen del tumor para evaluar una reducción en el crecimiento o el volumen de un tumor como un indicador de la eficacia terapéutica. Por ejemplo, las formulaciones de enzima de degradación de hialuronano (p. ej., hialuronidasa), tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p. ej., hialuronidasa PEGilada, tal como PEGPH20) y un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, se pueden administrar a un animal portador de tumor, y controlar el peso corporal y el volumen del tumor. El momento de la administración previa de la enzima de degradación de hialuronano se puede ajustar para evaluar el régimen de dosificación óptimo para la terapia combinada.

La actividad de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria se puede evaluar controlando la actividad antitumorigénica o tumoricida, tal como la reducción del tamaño del tumor y/o el retraso en la progresión del tumor. Por lo tanto, por ejemplo, las terapias combinadas se pueden evaluar para identificar aquellas que disminuyen la tasa de crecimiento del tumor o reducen el tamaño del tumor. Se puede evaluar el tamaño del tumor *in vivo* en modelos humanos o animales portadores de tumores tratados con cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria. La contracción del tumor o el tamaño del tumor se pueden evaluar mediante diversos ensayos conocidos en la técnica, tales como, mediante medición del peso, del volumen o física.

Se pueden generar modelos animales portadores de tumores. Se pueden generar tumores *in vivo* por medio de cualquier método conocido, incluyendo tumores singénicos generados por inoculación (p. ej., por inyección subcutánea) de una línea de células tumorales de ratón o rata en la cepa inmunocompetente de ratón o rata correspondiente, tumores metastásicos generados por metástasis de un tumor primario implantado en el modelo animal, tumores de aloinjerto generados por la implantación de células tumorales en la misma especie que el origen de las células tumorales, tumores de xenoinjerto por trasplante de líneas de células de cáncer humano o tumores sólidos a un ratón que tiene un sistema inmunológico deteriorado (p. ej., ratones atímicos) y tumores espontáneos generados por manipulación genética del animal. Los modelos de tumores se pueden generar de forma ortotópica mediante la inyección de las células tumorales en el tejido u órgano de su origen, por ejemplo, la implantación de células tumorales de mama en una almohadilla de grasa mamaria de ratón.

Típicamente, se utilizan modelos de animales singénicos o por aloinjerto. En tales modelos, los animales son inmunocompetentes. Se requiere un sistema inmunológico intacto para evaluar la activación del sistema inmunológico en respuesta a la terapia combinada que emplea inhibidores de puntos de control inmunitario. Se utilizan células singénicas o alogénicas (es decir, células del mismo fondo genético) para prevenir el rechazo y la inducción de una respuesta inmunitaria asociada con un xenoinjerto en un animal inmunocompetente. Los ejemplos no limitantes de modelos de ratones con tumores singénicos se exponen en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Modelo de tumor de ratón singénico		
Tipo de tumor	Nombre de línea celular	Cepa de ratones
Carcinoma	CT26.CL25	BALB/c
Carcinoma	CT26.WT	BALB/c
Carcinoma	MTC-M	BALB/c
Carcinoma cervical	U14	ICR
Carcinoma hepático	H22	ICR
Carcinoma pulmonar	Lewis	C57BL6
Carcinoma pulmonar	K7M2	BALB/c
Melanoma	B16F1, B16F10, B16BL6	C57BL6
Mieloma	P3X63Ag8.653	BALB/c
Sarcoma	S180	ICR
Sarcoma	A20	BALB/c

En algunos ejemplos, los tumores se pueden establecer mediante inyección intramuscular, adyacente al periostio tibial derecho, en axila con una suspensión de células tumorales (p. ej., 2×10^5 células/animal) en cualquier modelo animal de tumor, y típicamente en un anfitrión inmunocompetente (singénico). Los modelos animales incluyen modelos en cualquier organismo descrito en la presente memoria o conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, un mamífero, incluyendo monos y ratones. En algunos ejemplos, la prueba de las combinaciones proporcionadas puede incluir el estudio de la eficacia en primates (p. ej., modelo de mono cinomolgo) para facilitar la evaluación de la eficacia terapéutica dirigida contra el tumor. Los modelos de primates adicionales incluyen, pero no se limitan a, los que utilizan el mono Rhesus.

En algunos ejemplos, el receptor del tumor puede ser cualquier cepa murina adecuada. Los ejemplos de animales en los que se pueden trasplantar células tumorales incluyen ratones BALB/c, ratones C57BL/6. Otros ejemplos incluyen ratones transgénicos (incluyendo modificaciones genéticas para activar la expresión de un gen "knockin" y modificaciones genéticas para desactivar la expresión de un gen "knockout"). Por ejemplo, la terapia combinada proporcionada en la presente memoria se puede someter a prueba en un modelo de cáncer de ratón, por ejemplo, un modelo de ratón con tumor singénico. En este método, un tumor singénico o una línea de células tumorales se injertan o se inyectan en un ratón, y posteriormente el ratón se trata con una enzima de degradación de hialuronano (p. ej., una hialuronidasa, tal como un agente de degradación de hialuronano conjugado con polímero, por ejemplo una hialuronidasa soluble PEGilada (p. ej., PEGPH20), y un agente inhibidor/bloqueador de proteínas de puntos de control inmunitario, tales como un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1) para determinar la capacidad de la terapia combinada para reducir o inhibir el crecimiento y/o la metástasis del tumor.

El tamaño y el volumen del tumor se pueden controlar basándose en mecanismos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el tamaño y el volumen del tumor se pueden controlar mediante radiografía, ultrasonidos, necropsia, uso de calibres, microCT o mediante ^{18}F -FDG-PET. El tamaño del tumor también se puede evaluar visualmente. En ejemplos particulares, el tamaño del tumor (diámetro) se mide directamente usando calibres. En otros ejemplos, el volumen del tumor se puede medir utilizando un promedio de las mediciones del diámetro del tumor (D) obtenido por medio de calibres o evaluaciones de ultrasonido. El volumen se puede determinar a partir de la fórmula $V = D^3 \times \pi/6$ (para el diámetro medido utilizando calibres); la fórmula $V = [\text{longitud} \times (\text{anchura})^2]/2$ donde la longitud es el diámetro más largo y la anchura es el diámetro más corto perpendicular a la longitud; o $V = D^2 \times d \times \pi/6$ (para el diámetro medido mediante ultrasonido donde d es la profundidad o el espesor). Por ejemplo, se pueden realizar mediciones con calibre de la longitud del tumor (l) y la anchura (w) y el volumen del tumor se puede calcular como $\text{longitud} \times \text{anchura}^2 \times 0,52$.

En otro ejemplo, los volúmenes de tumores se miden por ultrasonido. En tal ejemplo, los animales se pueden anestésiar utilizando anestesia ligera con isoflurano y cubriendo la región de interés con gel de ultrasonido. El

cabezal de exploración se coloca sobre la región de interés y se localiza el centro del tumor por ultrasonido (p. ej., utilizando un aparato de ultrasonido VisualSonics Vevo 2100) en modo 2D. A continuación se captura una imagen en modo 3D y se analiza el volumen del tumor para calcular el volumen en mm³ (p. ej., utilizando el soporte lógico de obtención de imágenes Vevo 2100 v1.5.0).

En otro ejemplo, se pueden utilizar las exploraciones microCT para medir el volumen del tumor (véase p. ej., Huang et al. (2009) PNAS, 106: 3426-3430). En tal ejemplo, se puede inyectar a los ratones medio de contraste al 74% Optiray Pharmacy Ioversol para inyección (p. ej., 741 mg de Ioversol/mL), anestesiarse a los ratones y explorar mediante CT realizada con un escáner MicroCat 1A u otro escáner similar (p. ej., IMtek) (40 kV, 600 µA, 196 etapas de rotación, ángulo total o rotación = 196). Las imágenes pueden ser reconstruidas utilizando un soporte lógico (p. ej., Programa de soporte lógico RVA3; Imtek). Los volúmenes tumorales se pueden determinar utilizando el soporte lógico disponible (p. ej., Software Amira 3.1; Mercury Computer Systems).

Una vez que los tumores implantados alcanzan un tamaño o volumen predeterminado, se puede administrar la terapia combinada. Los tumores en progreso se pueden visualizar y el tamaño del tumor y el volumen del tumor se pueden medir utilizando cualquier mecanismo conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el volumen del tumor o el tamaño del tumor se pueden medir utilizando cualquiera de los mecanismos descritos en la presente memoria. El volumen y el tamaño del tumor se pueden evaluar o medir a intervalos periódicos durante un período de tiempo posterior a la administración de la combinación que se proporciona en la presente memoria, tal como, por ejemplo, al menos, o hasta, o una vez cada hora, cada 6 horas, cada 12 horas, cada 24 horas, cada 36 horas, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, cada 7 días, cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada mes o más después de la infección. Se puede hacer una gráfica del cambio de la mediana en el volumen del tumor a lo largo del tiempo. Se puede calcular el área total bajo la curva (AUC). También se puede calcular un índice terapéutico utilizando la fórmula $AUC_{\text{animales de control}} - AUC_{\text{animales tratados}} / AUC_{\text{animales de control}} \times 100$. Los animales de control pueden ser animales no tratados (tratados con vehículo), animales tratados con una terapia de control, tal como un anticuerpo de control de isotipo, o animales tratados con la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p. ej., PEGPH20) sola o un inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo anti-proteína de control inmunitario) solo.

La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se puede calcular en un punto de tiempo elegido utilizando el volumen promedio de tumor de los animales de prueba utilizando la fórmula: $1 - (\text{volumen de tumor promedio, artículo de prueba}_{(\text{último día})} - \text{volumen de tumor promedio, artículo de prueba}_{(\text{medición en el momento inicial})}) / (\text{volumen de tumor promedio, control}_{(\text{último día})} - \text{volumen de tumor promedio, control}_{(\text{medición en el momento inicial})}) \times 100\%$, en donde el artículo de prueba es la administración de la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como PEGPH20, y el inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1), individualmente o como una terapia combinada, en donde la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p. ej., PEGPH20) y el inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario) se administran al mismo tiempo, o secuencialmente, como se describe en la presente memoria. En ejemplos particulares, el inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1), se administra después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como PEGPH20. Los tumores de control son aquellos provenientes de animales no tratados (tratados con vehículo), animales tratados con una terapia de control, tal como un anticuerpo de control de isotipo, o animales tratados con la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p. ej., PEGPH20) sola o un inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario) solo.

La evaluación de la actividad de las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria puede incluir la identificación de dosificaciones o regímenes de dosificación que median una disminución en el tamaño del tumor (p. ej., diámetro), volumen o peso en comparación con los animales de control que portan tumores tratados o no tratados. Se entiende que una disminución en el tamaño del tumor, el volumen o el peso en comparación con los animales de control que portan tumores tratados o no tratados significa que la terapia combinada está mediando la regresión del tumor o la contracción observada o que la terapia combinada está mediando el retraso de la progresión del tumor en comparación con los animales que portan tumores tratados o no tratados. La contracción del tumor o el retraso en la progresión del tumor son parámetros indicativos de anti-tumorigenicidad.

La evaluación puede incluir la identificación de una terapia combinada que dé como resultado animales que muestren una razón de contracción del tumor, calculada como la razón del tumor de control: el tumor tratado, que es mayor que 1,0, por ejemplo, que es mayor que 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más. En ejemplos particulares, los resultados se presentan como una razón del área total de AUC durante el curso del tratamiento (AUC del tamaño del tumor o volumen de los animales de control/AUC tamaño del tumor o volumen de los animales tratados). Por ejemplo, una terapia combinada puede dar como resultado una razón de contracción del tumor en un sujeto según lo medido por el AUC que sea mayor que 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más. Se entiende que una razón de 1,2 o 5 significa que la

terapia combinada produce una disminución del tamaño o volumen del tumor y da como resultado una actividad antitumoral de 120% o 500% en comparación con la referencia o el control.

En ejemplos particulares, el índice terapéutico se determina como una medida de los efectos de una terapia combinada proporcionada sobre el tamaño o volumen del tumor. Una terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede tener un índice terapéutico que sea al menos o aproximadamente al menos o 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% o más en comparación con el índice terapéutico de un control.

En ejemplos adicionales, los tumores se pueden extraer de los animales y pesar. La administración de una combinación proporcionada en la presente memoria puede dar como resultado una disminución en el peso del tumor en comparación con los tumores recogidos de animales de control que portan tumores. El peso también se puede comparar con los tumores recogidos de animales tratados de control al mismo tiempo después de la administración. El cambio en el peso se puede presentar como una proporción del peso del tumor (peso del tumor de los animales de control/pesos del tumor de los animales tratados). Una terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede dar como resultado sujetos que muestren una razón de peso del tumor de control:tratado que sea mayor que 1,0, por ejemplo, que sea mayor que 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más. Se entiende que una razón de peso del tumor que sea de 1,2 o 5 significa que la terapia combinada produce una disminución del peso del tumor y da como resultado una actividad antitumorigénica de 120% o 500% en comparación con la referencia o el control.

La eficacia de la terapia combinada también se puede evaluar de acuerdo con las pautas que proporcionan un criterio de respuesta objetivo para evaluar la terapéutica anti-tumoral. Tales pautas son conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, las pautas publicadas incluyen aquellas publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (véase Organización Mundial de la Salud, "Manual de la OMS para informar sobre los resultados del tratamiento del cáncer" (1979) Publicación en offset de la OMS Núm. 48, Ginebra pág. 1-45 y Miller et al., (1981) Cancer. 47:207-214), y las publicadas como Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) (Eisenhauer et al., (2009) Eur J Cancer. 45(2):228-247). Estas pautas se proporcionan para definir cuándo los tumores en pacientes con cáncer mejoran ("responden"), permanecen igual ("estabilizan") o empeoran ("progresan") durante los tratamientos. Estos criterios se aplican solo a los fenotipos tumorales y no son una medida de que un paciente haya mejorado. Un médico a cargo evalúa el tratamiento de la enfermedad utilizando una combinación de las mediciones objetivas descritas en las pautas y con los criterios sintomáticos del paciente.

Por ejemplo, de acuerdo con las pautas no limitantes para evaluar la eficacia terapéutica sobre los tumores, la evaluación de la respuesta tumoral puede implicar la selección de hasta 5 tumores por órgano y hasta 10 tumores en total, que sean representativos de todos los órganos afectados. Los tumores se pueden seleccionar en función de su tamaño (es decir, aquellos con el diámetro más largo) y su idoneidad para mediciones repetidas precisas utilizando técnicas de obtención de imágenes o clínicas. Para la OMS, la suma de los productos de los dos diámetros perpendiculares más grandes (SPD), y para RECIST, una suma del diámetro más largo (LD) para cada uno de los tumores, se puede calcular y se puede referir como los SPD en el momento inicial o la suma de LD en el momento inicial, respectivamente. El SPD en el momento inicial, o la suma de LD en el momento inicial, son la referencia con la cual se compara la respuesta del tumor para su evaluación. La presencia de otros tumores, no seleccionados para la medición, es decir, los tumores "no diana", también se indican en las pautas RECIST.

Los tumores se pueden medir por cualquier método reproducible. Por ejemplo, se pueden utilizar la TC (tomografía computarizada) o la MRI (imagen de resonancia magnética) con cortes de 10 mm o menos de grosor de la sección, o la TC espiral con un algoritmo de reconstrucción continua de 5 mm, para medir el tamaño del tumor. En algunos ejemplos, los tumores se pueden medir mediante una radiografía de tórax o una ecografía. También puede ser posible medir tumores mediante endoscopia o laparoscopia.

Al finalizar y/o en los puntos de tiempo intermedios predeterminados de un estudio clínico, se puede calcular el SPD o la suma de LD y se puede evaluar la respuesta de la siguiente manera. Una respuesta completa (CR) se define como la desaparición de todos los tumores medidos. Para la OMS, la desaparición debe observarse en dos observaciones consecutivas con un intervalo de no menos de 4 semanas. Los tumores se clasifican en los que muestran una respuesta parcial (RP) cuando hay al menos una disminución de 50% en el SPD (OMS) o una disminución de 30% en la suma de LD (RECIST), utilizando el SPD en el momento inicial o la suma de LD en el momento inicial como referencia, respectivamente. Para la OMS, el tumor se clasifica como una enfermedad progresiva (PD) cuando hay un aumento de al menos 25% en el SPD en comparación con el SPD más pequeño desde el inicio del tratamiento (es decir, nadir) y/o progresión de tumores no diana y/o la aparición de nuevos tumores en cualquier momento. Para RECIST, el tumor se clasifica como una enfermedad progresiva (PD) cuando hay al menos un aumento de 20% en la suma de LD, tomando como referencia la menor suma de LD registrada desde el inicio del tratamiento (es decir, nadir) o la aparición de nuevos tumores. El tumor se considera una enfermedad estable (SD) cuando la contracción del tumor es inferior a 50%, pero el crecimiento del tumor no supera 25% en comparación con el nadir, siempre que no haya nuevos tumores y el tamaño de los tumores no diana no

aumente. De manera similar, de acuerdo con las pautas de RECIST, el cáncer se considera una SD cuando la contracción del tumor es inferior a 30%, pero no muestra un aumento de más de 20% en la suma de LD, sin tumores nuevos y sin aumento en el tamaño de tumores no diana.

- 5 Las pautas de la OMS y RECIST se desarrollaron para el seguimiento de las respuestas y para evaluar las terapias de los tumores citotóxicos. Como se describió anteriormente, los tratamientos de inmunoterapia muestran algunas respuestas distintas de las de los tratamientos citotóxicos. Por ejemplo, un aumento temprano en la carga tumoral y/o la aparición de nuevos tumores son una señal de enfermedad progresiva (PD), de acuerdo con las pautas de RECIST, y se considera una indicación de fracaso del fármaco. De acuerdo con los protocolos que se basan en tales
- 10 pautas, a menudo se recomienda el cese del tratamiento una vez que un tumor se ha caracterizado como PD. En el caso de las inmunoterapias, sin embargo, un aumento inicial en el tamaño del tumor puede ser indicativo de infiltración de células inmunitarias o una respuesta inflamatoria transitoria, que indica eficacia en lugar de fracaso del fármaco. Por lo tanto, se ha desarrollado un conjunto de pautas, específicas para inmunoterapias, denominadas criterios de respuesta relacionada con el sistema inmunológico (irRC) (Volchok et al., (2009) Clin Cancer Res. 15(23):7412-7420 y Nishino et al., (2013) Clin Cancer Res. 19(14):3936-3943). Por lo tanto, en los ejemplos de la presente memoria, la eficacia terapéutica se puede evaluar de acuerdo con las pautas de irRC, u otras pautas similares conocidas por un experto en la técnica. En la Tabla 7 a continuación se expone una comparación de las pautas.

Tabla 7. Comparación de guías para la evaluación de tumores sólidos

	Evaluación bidimensional		Evaluación unidimensional	
	OMS	irRC	RECIST	irRC
Lesiones medibles	≥5 × 5 mm ² por mediciones bidimensionales	≥5 × 5 mm ² por mediciones bidimensionales	≥10 mm en el diámetro más largo	≥10 mm en el diámetro más largo
Medición de cada lesión	El diámetro más largo × el diámetro perpendicular más largo (cm ²)	El diámetro más largo × el diámetro perpendicular más largo (cm ²)	El diámetro más largo (cm)	El diámetro más largo (cm)
Carga tumoral (suma de mediciones)	La suma de las mediciones bidimensionales de las lesiones diana (solamente)	La suma de las mediciones bidimensionales de todas las lesiones diana y nuevas lesiones, si las hay	La suma de los diámetros más largos de las lesiones diana solamente	La suma de los diámetros más largos de todas las lesiones diana y nuevas lesiones, si las hay
Nuevas lesiones medibles	Representa siempre PD	No define progresión; Incorporado a la carga tumoral	Representa siempre PD	La presencia de nuevas lesiones no define la progresión. Las mediciones de las nuevas lesiones están incluidas en la suma de las mediciones.
Nuevas, no medibles	Representa siempre PD	No define progresión	Representa siempre PD	No define progresión
Lesiones sin índice	Los cambios contribuyen a la definición de CR, PR, SD y PD	Contribuye a la definición de irCR (se requiere desaparición completa)	Los cambios contribuyen a la definición de CR, PR, SD y PD	Contribuye a la definición de irCR (se requiere desaparición completa)
CR	Desaparición de todas las lesiones *	Desaparición de todas las lesiones *	Desaparición de todas las lesiones *	Desaparición de todas las lesiones *
PR	≥50% de disminución en SPD de todas las lesiones del índice en comparación con el momento inicial *	≥50% de disminución en la carga tumoral en comparación con el momento inicial *	≥30% de disminución desde el momento inicial *	≥30% de disminución desde el momento inicial *
SD	<50% de disminución en la carga tumoral en comparación con el momento inicial y <25% de aumento desde el nadir, sin lesiones nuevas y sin progresión de lesiones no diana	<50% de disminución en la carga tumoral en comparación con el momento inicial y <25% de aumento desde el nadir	<30% de disminución en la carga tumoral en comparación con el valor basal y <20% de aumento desde el nadir, sin lesiones nuevas y sin progresión de lesiones no diana	<30% de disminución en la carga tumoral en comparación con el momento inicial y <20% de aumento desde el nadir

Tabla 7. Comparación de guías para la evaluación de tumores sólidos

	Evaluación bidimensional		Evaluación unidimensional	
	OMS	irRC	RECIST	irRC
PD	≥25% desde el nadir *, y/o cualquier aumento en el tamaño de las lesiones no diana y/o cualquier lesión nueva (en cualquier punto temporal)	≥25% de incremento desde el nadir *	≥20% de aumento desde el nadir *, y/o cualquier aumento en el tamaño de las lesiones no diana y/o cualquier nueva lesión (en cualquier punto temporal)	≥20% de incremento desde el nadir *

* Se requiere confirmación por 2 observaciones consecutivas con un intervalo de no menos de 4 semanas.

Cualquiera o todas las pautas de la OMS, RECIST e irRC, u otras pautas conocidas por un experto en la técnica e indicativas de una respuesta al tratamiento de un tumor, se puede utilizar para evaluar la eficacia de los tratamientos combinados que se proporcionan en la presente memoria. Los métodos ilustrativos para evaluar las actividades anti-tumorales de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria se describen a continuación en la Sección G.3.

b. Presencia de marcadores tumorales

La presencia y la extensión de los marcadores tumorales, en la sangre, la orina o los tejidos corporales, también se pueden medir y utilizar para la evaluación de la respuesta. Un experto en la técnica sabe que tales marcadores se correlacionan con la respuesta al tratamiento del tumor. La presencia del marcador se puede comparar con un sujeto control o una población de sujetos que no tienen un tumor o una muestra del momento inicial de un sujeto antes del tratamiento o antes de la última dosis o intervalo de terapia. La expresión del marcador a niveles superiores a un control o muestra normal se correlaciona con la existencia de un tumor. Una disminución en el nivel o el grado del marcador en relación con una muestra del momento inicial puede indicar una respuesta al tratamiento. En algunos ejemplos, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador intracelular, un aumento en el marcador en la sangre periférica es indicativo de la lisis de células tumorales y la eficacia terapéutica de la inmunoterapia. Se ha creado una base de datos que contiene secuencias de péptidos antigénicos asociados a tumores definidos por células T (Vigneron et al., (2013) Cancer Immun. 13:15; véase p. ej., también bases de datos, tales como cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet). Los marcadores tumorales ilustrativos y sus tipos de tumores asociados se exponen en la Tabla 8 a continuación:

Tabla 8. Marcadores tumorales ilustrativos y tipos de tumores asociados

Marcador tumoral	Tipos de tumor asociado
Alfa fetoproteína (AFP)	tumor de células germinales, carcinoma hepatocelular
CA15-3	cáncer de mama
CA27-29	cáncer de mama
CA19-9	cáncer pancreático, también cáncer colorrectal y otros tipos de cáncer gastrointestinal
CA-125	cáncer de ovario, también cáncer de endometrio, cáncer de trompa de Falopio, cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer gastrointestinal
Calcitonina	carcinoma medular de tiroides
Calretinina	mesotelioma, tumor del estroma gonadal del cordón sexual, carcinoma adrenocortical, sarcoma sinovial
Antígeno Carcinoembrionario (CEA)	cáncer gastrointestinal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer del tracto urinario
CD34	hemangiopericitoma/tumor fibroso solitario, lipoma pleomorfo, tumor del estroma gastrointestinal, dermatofibrosarcoma protuberans
CD99	sarcoma de Ewing, tumor neuroectodérmico primitivo, hemangiopericitoma/tumor fibroso solitario, sarcoma sinovial, linfoma, leucemia, tumor del estroma del cordón sexual gonadal

Tabla 8. Marcadores tumorales ilustrativos y tipos de tumores asociados	
Marcador tumoral	Tipos de tumor asociado
CD117	tumor estromal gastrointestinal, mastocitosis, seminoma
Cromogranina	tumor neuroendocrino
Cromosomas 3, 7, 17 y 9p21	vejiga
Citoqueratina (varios tipos)	muchos tipos de carcinoma, algunos tipos de sarcoma
Desmina	sarcoma de músculo liso, sarcoma de músculo esquelético, sarcoma del estroma endometrial
Antígeno de membrana epitelial (EMA)	muchos tipos de carcinoma, meningioma, algunos tipos de sarcoma
Antígeno tumoral epitelial (ETA)	cáncer de mama
Factor VIII, CD31 FL1	sarcoma vascular
Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	glioma (astrocitoma, ependimoma)
Proteína del fluido de la enfermedad quística grave (GCDFP-15)	cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de glándula salival
HMB-45	melanoma, PEComa (por ejemplo, angiomiolipoma), carcinoma de células claras, carcinoma adrenocortical
Gonadotropina coriónica humana (hCG)	enfermedad trofoblástica gestacional, tumor de células germinales, coriocarcinoma
Inmunoglobulina	linfoma, leucemia
Inhibina	tumor del estroma gonadal del cordón sexual, carcinoma adrenocortical, hemangioblastoma
Queratina (varios tipos)	carcinoma, algunos tipos de sarcoma
Marcador de linfocitos (varios tipos)	linfoma, leucemia
MART-1 (Melan-A)	melanoma, tumores productores de esteroides (carcinoma adrenocortical, tumor gonadal)
Antígeno asociado al melanoma (MAGE)	melanoma maligno
MUC-1	cáncer de mama
Actina específica del músculo (MSA)	miosarcoma (leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma)
Myo D1	rabdomiosarcoma, tumor pequeño, redondo, de células azules.
Neurofilamento	Tumor neuroendocrino, carcinoma de células pequeñas del pulmón.
Enolasa específica de neuronas (NSE)	tumor neuroendocrino, carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama
NY-ESO-1	melanoma, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de próstata carcinoma hepatocelular
Fosfatasa alcalina placentaria (PLAP)	seminoma, disgerminoma, carcinoma embrionario
Antígeno específico de próstata	Próstata
PTPRC (CD45)	linfoma, leucemia, tumor histiocítico

Tabla 8. Marcadores tumorales ilustrativos y tipos de tumores asociados	
Marcador tumoral	Tipos de tumor asociado
Proteína S100	melanoma, sarcoma (neurosarcoma, lipoma, condrosarcoma), astrocitoma, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de glándula salival, algunos tipos de adenocarcinoma, tumor histiocítico (células dendríticas, macrófagos)
Actina del músculo liso (SMA)	tumor del estroma gastrointestinal, leiomioma, leiomioma, leiomioma
Sinaptofisina	tumor neuroendocrino
Tiroglobulina	marcador postoperatorio del cáncer de tiroides (pero no en el cáncer medular de tiroides)
Factor de transcripción tiroideo-1	todos los tipos de cáncer de tiroides, cáncer de pulmón
Tumor M2-PK	cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario
Tirosinasa	melanoma maligno
Vimentina	sarcoma, carcinoma de células renales, cáncer de endometrio, carcinoma de pulmón, linfoma, leucemia, melanoma

En algunos casos, de acuerdo con varias pautas para evaluar la eficacia terapéutica, tales como las que se analizaron anteriormente, los niveles de marcadores combinados con los tamaños de los tumores no diana también se tienen en cuenta entre los criterios de respuesta, y refiriéndose la CR a la desaparición de todos tumores no diana y niveles normales de marcadores tumorales, refiriéndose la respuesta incompleta o SD a la persistencia de uno o más tumores no diana y/o niveles de marcadores tumorales por encima de los límites normales, y refiriéndose PD a la aparición de uno o más tumores nuevos y/o progresión de tumores no diana existentes.

c. Seguimiento inmunológico

La terapia combinada proporcionada en la presente memoria actúa inhibiendo la actividad de la proteína de puntos de control inmunitario y, por lo tanto, reduciendo la inhibición de una respuesta inmunitaria o aumentando una respuesta inmunitaria, de modo que el sujeto que recibe la terapia combinada proporcionada en la presente memoria pueda desarrollar inmunidad anti-tumoral. Se pueden utilizar varios criterios para evaluar la terapia inmunológica en tumores sólidos para evaluar una respuesta inmunitaria en un sujeto, tal como en pacientes o modelos animales, que se correlacionan con la eficacia clínica de un tratamiento para el cáncer (véase, p. ej., Clay et al., (2001) Clin Cancer Res. 7:1127-1135). El seguimiento inmunológico puede incluir, pero no se limita a, el seguimiento de la frecuencia de tipos celulares específicos, tales como células inmunitarias específicas, en sangre periférica o en tumores, seguimiento de los cambios en los niveles de expresión de marcadores específicos en células inmunitarias, cuantificación de las respuestas inmunitarias específicas de antígeno incluyendo las respuestas de anticuerpos y células T CD4+ o CD8+, y el seguimiento de los cambios en los niveles periféricos de citoquinas producidas por poblaciones de células inmunitarias específicas.

(i) Frecuencia de tipos celulares específicos en sangre periférica

Se pueden utilizar recuentos de tipos de células inmunitarias específicas en la sangre o tejidos periféricos, tales como los tejidos asociados con una respuesta inmunitaria (p. ej., bazo o ganglios linfáticos) o tumores, para correlacionar los tratamientos del cáncer con la eficacia clínica. La frecuencia de tipos celulares específicos en la sangre de pacientes o animales tratados se puede determinar, por ejemplo, utilizando métodos de citometría de flujo. Cuando se utiliza la citometría de flujo para obtener los recuentos de tipos celulares, se puede emplear un enfoque de plataforma dual o un enfoque de plataforma única.

En un enfoque de plataforma dual, se utiliza un citómetro de flujo para determinar las células de interés como porcentaje de una población de referencia, tal como los linfocitos T CD4+ como porcentaje de la población total de linfocitos. El recuento absoluto de glóbulos blancos (GB) y el porcentaje de linfocitos se determinan mediante un analizador de hematología, utilizando procedimientos convencionales. El recuento absoluto de linfocitos T CD4+, por lo tanto, es el producto de los GB absolutos, el porcentaje de linfocitos y el porcentaje de linfocitos T CD4+. La población de células de interés se puede identificar, por ejemplo, utilizando limitaciones de dispersión de luz, tales como las limitaciones de dispersión frontal y dispersión lateral, para identificar las células de interés basándose en la

morfología. En métodos particulares, las muestras de sangre se pueden incubar con anticuerpos que reconocen uno o más marcadores inmunológicos y se pueden utilizar estrategias de selección unidimensionales o multidimensionales para identificar la población de interés. Estos métodos son rutinarios para los expertos en la técnica. Los marcadores ilustrativos no limitantes, que se pueden utilizar para distinguir poblaciones particulares de linfocitos, se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9. Marcadores de reconocimiento de linfocitos	
Tipo de célula	Marcadores fenotípicos
Células NK	CD16 CD56 pero no CD3
Células T coadyuvantes	TCRαβ, CD3 y CD4
Células T citotóxicas	TCRαβ, CD3, CD8, CD107, IFN
Células T γδ	TCRγδ y CD3
Células B	MHC clase II, CD19 y CD21

En un enfoque de plataforma única, el recuento de células se obtiene del citómetro de flujo por sí solo, sin la necesidad de un analizador de hematología. Para este método, un volumen conocido y preciso de muestra se mezcla con los anticuerpos relevantes dirigidos al marcador o los marcadores inmunológicos que se vayan a detectar, y se emplea una estrategia de selección para identificar con precisión la población celular de interés. La población celular se puede relacionar a continuación con el volumen mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen métodos de calibración con microcuentas, volumétricos, microfluorométricos y de velocidad de flujo.

El método más común para determinar la concentración de la población celular de interés es mediante el uso de microcuentas. Por ejemplo, se mezclan una muestra y microcuentas (con un diámetro de 5-10 μm), suspendidas en una concentración conocida, en volúmenes iguales. El número de eventos celulares y el número de eventos de cuentas se cuentan, y la concentración de células absoluta se determina mediante la fórmula: Recuento de células absoluto = Número de eventos celulares/Número de eventos de cuentas x concentración de cuentas.

En algunos ejemplos de seguimiento inmunológico, se determina el recuento absoluto de linfocitos (ALC), por ejemplo, en muestras recolectadas de sangre, bazo o tejidos de ganglios linfáticos que drenan el tumor, o biopsias de tumores antes del tratamiento y en uno o más momentos predeterminados después de la administración de la Terapia proporcionada. El recuento absoluto de linfocitos es el número de linfocitos en sangre periférica por unidad de volumen. El ALC se puede determinar antes o en el mismo día de la administración de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria y periódicamente en varios momentos después de la administración, tal como después de la administración anterior o la última administración de un ciclo de administración, por ejemplo al menos o hasta o cada 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas o 12 semanas después de la administración, tal como después de la administración anterior o la última administración de un ciclo de administración, de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria, tal como 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración. Un aumento en el ALC a lo largo del tiempo antes y durante el tratamiento inmunoterapéutico, indica un aumento en la proliferación de células inmunitarias y se ha correlacionado positivamente con el beneficio clínico (Berman et al., (2009) J Clin Oncol 27: 15s, (supl; resumen 3020)). En algunos ejemplos, el ALC 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas o 12 semanas después de la administración, tal como después de la administración anterior o la última administración en un ciclo de administración, se incrementa 1,1 veces, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más veces, en comparación con el ALC en el momento anterior o en el mismo día de la administración y se correlaciona con un efecto terapéutico.

En otros ejemplos, los recuentos absolutos de células asesinas naturales (NK) (que expresan marcadores CD16 y CD56 pero no CD3), células T coadyuvantes (que expresan marcadores TCRαβ, CD3 y CD4), células T citotóxicas (o células T efectoras; que expresan los marcadores TCRαβ, CD3 y CD8 o los marcadores CD8, CD107 e IFN), o células B (que expresan marcadores del MHC de clase II, CD19 y CD21), se pueden determinar como un método para medir la actividad inmunológica en respuesta a la administración de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria, donde el aumento en una o más de estas poblaciones de linfocitos indica un aumento en la actividad inmunitaria. Los recuentos de células asesinas naturales (NK), células T coadyuvantes, células T citotóxicas (o células T efectoras) y/o células B, se pueden determinar antes o el mismo día de la administración de la terapia combinada inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria y a los 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas o 12 semanas después de la administración, tal como después de la administración anterior o la última administración de un ciclo de administración, de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria, tal como 1 día, 2 días, 3

días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración. Un aumento en los recuentos de células asesinas naturales (NK), células T coadyuvantes, células T citotóxicas (o células T efectoras) y/o células B a lo largo del tiempo antes y durante el tratamiento inmunoterapéutico, indica un aumento en la proliferación de células inmunitarias y se puede correlacionar positivamente con el beneficio clínico. En algunos ejemplos, los recuentos de células asesinas naturales (NK), células T coadyuvantes, células T citotóxicas (o células T efectoras) y/o células B a los 1 día; 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas o 12 semanas después de la administración, tal como después de la administración anterior o la última administración de un ciclo de administración, se incrementan 1,1 veces, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más veces, en comparación con los recuentos de células asesinas naturales (NK), células T coadyuvantes, células T citotóxicas (o células T efectoras) y/o células B antes o el mismo día que la administración y se correlacionan con un efecto terapéutico.

La evaluación de números relativos de tipos de células supresoras, tales como las células T_{reg} también se puede medir por citometría de flujo, por ejemplo, mediante la selección de la positividad para CD25, Foxp2 y CD4. Las muestras para determinar los recuentos de células T_{reg} se pueden tomar, por ejemplo, del bazo, los ganglios linfáticos, tales como los ganglios linfáticos que drenan los tumores o la sangre. Un aumento en el número de células T_{reg} se ha correlacionado con un resultado clínico pobre (véase Callahan et al., (2010) Semin Oncol. 37(5):473-484). Los recuentos de tipos de células inmunitarias supresoras, tales como las células T_{reg} , se pueden medir antes y en diferentes puntos temporales después de la administración de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. Por ejemplo, los recuentos de tipos de células inmunitarias supresoras, tales como las células T_{reg} se pueden determinar el mismo día de la administración de la terapia combinada inmunomoduladora proporcionada en la presente memoria y 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas o 12 semanas después de la administración, tal como después de la administración previa o la última administración de un ciclo de administración, de la terapia combinada que se proporciona en la presente memoria, tal como 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración. En algunos ejemplos, se puede determinar una dosis terapéutica máxima de la terapia combinada proporcionada como la dosis máxima que no induce un aumento en el número de tipos de células inmunitarias supresoras, tales como las células T_{reg} , en un paciente o modelo animal a los 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días de la administración, tal como después de la administración anterior o la última administración de un ciclo de administración, en comparación con el nivel de células T_{reg} antes de la administración, en donde se determina que un aumento en el número de tipos de células inmunitarias supresoras, tales como las células T_{reg} , es un 1,1 veces, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más veces, el aumento en el número de tipos de células inmunitarias supresoras, tales como las células T_{reg} , en el punto temporal medido en comparación con el número de tales células antes o en el mismo día de la administración de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria.

En algunos ejemplos, la administración de la terapia combinada proporcionada puede efectuar un cambio en la cantidad absoluta del número de células efectoras y/o supresoras, y/o la razón entre estos subconjuntos. En algunos ejemplos, un aumento en el efecto anti-tumoral se correlaciona con un aumento en la razón de células efectoras con respecto al número de células supresoras, en donde la razón de células efectoras con respecto a las células supresoras en el punto temporal medido es 1,1 veces, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más que la razón anterior o el mismo día de la administración de la terapia combinada proporcionada.

(ii) Detección de marcadores de células inmunitarias

En algunos ejemplos, la detección de marcadores particulares en células inmunitarias se puede utilizar para correlacionar los tratamientos del cáncer con la eficacia terapéutica. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a, coestimulador inducible (ICOS), HLA-DR (MHC II humano) y CD45RO.

En algunos ejemplos, se detecta ICOS sobre la superficie de las células T para realizar un seguimiento de la eficacia terapéutica de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. El ICOS es un miembro de la familia de genes Ig y se expresa sobre las células T CD4+ y CD8+ después de la activación. Un aumento en la frecuencia de las células CD4+ que expresan altos niveles de ICOS se correlaciona con la activación del sistema inmunológico y la eficacia terapéutica.

HLA-DR se expresa sobre las células T y se regula por aumento en los puntos temporales posteriores a la activación, y CD45RO es un marcador establecido para las células T de memoria. Los aumentos en el número de células inmunitarias que expresan HLA-DR y/o CD45RO también se pueden utilizar para el seguimiento de la eficacia de las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria.

Las muestras para la detección de marcadores de células inmunitarias se pueden recoger de sangre periférica o tejidos, tales como tejidos asociados con una respuesta inmunitaria (p. ej., bazo o ganglios linfáticos) antes de la administración de una terapia combinada proporcionada en la presente memoria o en el mismo día de la

administración y/o a los 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas o 12 semanas después de la administración, tal como después de la administración anterior o la última administración de un ciclo de administración, de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria, tal como 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración. Los marcadores se pueden determinar, por ejemplo, utilizando métodos de citometría de flujo, inmunofluorescencia y/o transferencia Western. Tales métodos son bien conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria.

(iii) Respuestas inmunitarias específicas de antígeno

En algunos ejemplos, se pueden utilizar respuestas inmunitarias específicas de antígenos para evaluar la eficacia terapéutica de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. Cuando se monta una respuesta inmunitaria en un sujeto que porta un tumor, el sujeto típicamente mostrará niveles elevados de células inmunitarias que reconocen antígenos específicos del tumor, o antígenos asociados al tumor (TAA), tales como las células T específicas del antígeno tumoral. Por lo tanto, un aumento en el número de células T específicas de tumores, p. ej., linfocitos T citotóxicos (CTL) o células T CD4+, que se unen específicamente a uno o más antígenos asociados a tumores, tales como los TAA en el contexto de los complejos principales de histocompatibilidad (MHC) (p. ej., los complejos MHC de clase I o clase II), por ejemplo, después de un tratamiento inmunoterapéutico, es indicativo de una mayor respuesta antitumoral como resultado del tratamiento. Por lo tanto, los ensayos de unión que utilizan antígenos asociados a tumores y células inmunitarias circulantes o localizadas en tumores se pueden utilizar para determinar si el anfitrión ha desarrollado una respuesta incrementada al antígeno o los antígenos asociados a tumores en respuesta a una inmunoterapia. Por ejemplo, los expertos en la técnica conocen antígenos asociados a tumores para tipos específicos de cáncer o se pueden determinar empíricamente. Los antígenos tumorales ilustrativos, no limitantes, y sus cánceres asociados, se enumeran en la Tabla 8 anterior, en la sección G.3.b.

La promoción de la respuesta inmunitaria mediante la administración de una terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede producir, o mejorar, una respuesta inmunitaria dirigida a uno o más antígenos asociados a tumores, según lo indicado por un aumento en el número de células inmunitarias en circulación o en el tumor, que se unen específicamente al antígeno o los antígenos asociados al tumor. Por lo tanto, la detección de, o un aumento en, la respuesta inmunitaria específica de un antígeno tumoral después de la administración de una terapia combinada proporcionada en la presente memoria son indicativos de la eficacia terapéutica.

Una respuesta inmunitaria específica de antígeno tumoral se puede medir, por ejemplo, *ex vivo*, utilizando un ensayo de tetrámero de MHC, un ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada, de puntos (ELISPOT), un ensayo de estimulación de células T y/o un ELISA. Tales métodos son bien conocidos por el experto en la técnica (véanse p. ej., James et al., (2009) *J Vis Exp.* (25): 1167, Lycke et al., (2001) *Curr Protoc Immunol*. Capítulo 7: Unidad 7.14; Kruisbeek et al., (2004) *Curr Protoc Immunol*. Capítulo 3: Unidad 3.12, y en la presente memoria). Las muestras de sangre periférica, de pacientes que portan tumores o modelos animales, se recogen antes o el mismo día de la administración de una terapia combinada proporcionada en la presente memoria y en uno o más puntos temporales cualesquiera predeterminados después de la administración de la terapia proporcionada, tal como 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas o 12 semanas después de la administración, tal como después de la administración previa o la última administración de un ciclo de administración, de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria, tal como 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración. A continuación, las muestras de sangre se fraccionan y se analizan utilizando uno o más de un ensayo de tetrámero de MHC, un ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada de puntos (ELISPOT), un ensayo de estimulación de células T y/o un ELISA para evaluar la inducción de una respuesta inmunitaria. Se considera que se efectúa una respuesta inmunitaria específica de antígeno cuando la respuesta medida después del tratamiento aumenta 1,1 veces, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más, en comparación con la muestra en el momento inicial, la respuesta medida antes del tratamiento o el día del tratamiento. La inducción de la respuesta inmunitaria específica del antígeno tumoral después de la administración de la terapia combinada proporcionada es indicativa de eficacia terapéutica.

4. Ensayos farmacocinéticos y farmacodinámicos

Los estudios farmacocinéticos y de tolerabilidad se pueden realizar utilizando modelos animales o se pueden realizar durante estudios clínicos con pacientes para evaluar el efecto de las combinaciones y composiciones proporcionadas en la presente memoria. Los modelos animales incluyen, pero no se limitan a, modelos de ratones, ratas, conejos, perros, cobayas y primates no humanos, tales como monos *Cynomolgus* o macacos Rhesus. En algunos casos, los estudios farmacocinéticos y de tolerabilidad se realizan con animales sanos. En otros ejemplos, los estudios se realizan utilizando modelos animales de una enfermedad para los cuales se considera la terapia con una combinación o composición de la presente memoria, tales como los modelos animales de cáncer.

Las propiedades farmacocinéticas de las combinaciones o composiciones proporcionadas en la presente memoria

se pueden evaluar midiendo parámetros tales como la concentración máxima (pico) de agente inmunoterapéutico (o enzima de degradación de hialuronano) (C_{max}), el tiempo pico (es decir, cuando se produce la concentración máxima del agente inmunoterapéutico; T_{max}), el agente inmunoterapéutico, o enzima de degradación de hialuronano mínimos, la concentración (es decir, la concentración mínima entre dosis de agente inmunoterapéutico; C_{min}), la semi-vida de eliminación ($T_{1/2}$) y área bajo la curva (es decir, el área bajo la curva generada al trazar el tiempo frente a la concentración; AUC), después de la administración. Típicamente, las composiciones que contienen los agentes activos de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria se administran sistémicamente, tal como típicamente por vía intravenosa. En los casos en los que el agente inmunoterapéutico, o la enzima de degradación del hialuronano, se administran por vía subcutánea, la biodisponibilidad absoluta del agente o la enzima se determina comparando el área bajo la curva del agente inmunoterapéutico, o la enzima de degradación del hialuronano, después del suministro subcutáneo (AUC_{SC}) con el AUC del agente inmunoterapéutico, o enzima de degradación del hialuronano, después del suministro intravenoso (AUC_{IV}). La biodisponibilidad absoluta (F) se puede calcular utilizando la fórmula: $F = ([AUC]_{SC} \times dosis_{SC}) / ([AUC]_{IV} \times dosis_{IV})$. La concentración de agente inmunoterapéutico, o enzima de degradación de hialuronano, en el plasma después de la administración subcutánea se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica adecuado para evaluar las concentraciones de un agente inmunoterapéutico, o enzima de degradación de hialuronano, en muestras de sangre.

En los estudios farmacocinéticos se puede administrar un intervalo de dosis y una frecuencia de dosificación diferente de la dosificación para evaluar el efecto del aumento o la disminución de las concentraciones de una terapia coadministrada (p. ej., agente inmunoterapéutico y una enzima de degradación de hialuronano). Las propiedades farmacocinéticas de los agentes terapéuticos administrados, tales como la biodisponibilidad, también se pueden evaluar con o sin coadministración del otro agente, es decir, enzima de hialuronano conjugada con polímero y/o el inhibidor de puntos de control inmunitario. Por ejemplo, a los perros, tales como perros Beagle, se les puede administrar un inhibidor de puntos de control inmunitario combinado con un enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como después de la administración de la enzima de degradación del hialuronano conjugada con polímero, o se pueden administrar un inhibidor de puntos de control inmunitario o una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero solos, utilizando una o más vías de administración. Tales estudios se pueden realizar para evaluar el efecto de la administración conjunta con un agente anti-hialuronano, tal como una hialuronidasa, sobre las propiedades farmacocinéticas, tales como la biodisponibilidad, del inhibidor de puntos de control inmunitario.

Los estudios para evaluar la seguridad y la tolerabilidad también son conocidos en la técnica y se pueden utilizar en la presente memoria. Tras la administración de la combinación y las composiciones de la presente memoria, se puede realizar un seguimiento del desarrollo de cualquier reacción adversa. Las reacciones adversas pueden incluir, pero no se limitan a, reacciones en el lugar de la inyección, tales como edema o hinchazón, dolor de cabeza, fiebre, fatiga, escalofríos, sofocos, mareos, urticaria, sibilancias u opresión en el pecho, náuseas, vómitos, rigidez, dolor de espalda, dolor de pecho, calambres musculares, ataques o convulsiones, cambios en la presión arterial y respuestas anafilácticas o de hipersensibilidad severa.

También se puede realizar un seguimiento del desarrollo de eventos adversos relacionados con el sistema inmunológico (irAE). Los irAE incluyen erupciones cutáneas, pero en casos raros pueden progresar a necrólisis epidérmica tóxica potencialmente mortal, y colitis, caracterizada por una diarrea leve a moderada, pero en ocasiones también severa y persistente. En algunos ejemplos, también se puede producir hipofisitis, hepatitis, pancreatitis, iridociclitis, linfadenopatía, neuropatías en respuesta a la inmunoterapia. Los efectos secundarios también pueden incluir efectos secundarios musculoesqueléticos (véase la Publicación de Estados Unidos Núm. 2012/0020951). Por lo general, se puede administrar un intervalo de dosificación y diferentes frecuencias de dosificación en los estudios de seguridad y tolerabilidad para evaluar el efecto del aumento o la disminución de las concentraciones del inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1) y/o un agente anti-hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímeros, sobre cualquier efecto secundario observado.

G. Métodos y usos de la terapia combinada

Las combinaciones y composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden utilizar en métodos de terapia para el tratamiento de cánceres, y en particular cánceres caracterizados por tumores sólidos que tienen un fenotipo de HA de al menos moderado a alto. En los métodos, se administra una terapia combinada de enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, es decir, una hialuronidasa, tal como una PH20, por ejemplo PEGPH20 y un inhibidor de puntos de control inmunitario, es decir, un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario (p. ej., se administra un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1) a un sujeto que tiene un tumor sólido que se caracteriza por tener niveles de HA de al menos moderados a altos. En algunos ejemplos, se puede incluir un agente o terapia antineoplásicos adicionales, tal como un agente quimioterapéutico, radioterapia o cirugía en las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria.

Como se encuentra en la presente memoria, los efectos anti-tumorales de un agente inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario (p. ej., anti-CTLA4 o anti-PD-1),

cuando se administran en un régimen combinado con una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, exceden los efectos de la administración del anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario solo. En particular, tales resultados se producen cuando la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p. ej., la hialuronidasa soluble conjugada con polímero, tal como PEGPH20) se administra antes de administrar el inhibidor de puntos de control inmunitario, y generalmente hasta 48 horas (p. ej., 24 horas) antes. Por ejemplo, los efectos pueden ser sinérgicos o pueden ser aditivos. La actividad antitumoral observada en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria logra resultados que hasta ahora no se han logrado con las inmunoterapias existentes.

1. Cánceres

La terapia combinada de un agente anti-hialuronano, p. ej., enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, y un agente que aumenta la respuesta inmunitaria al bloquear una proteína de puntos de control inmunitario (es decir, un inhibidor de puntos de control inmunitario), tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1), se puede utilizar para el tratamiento de células cancerosas, neoplasias, tumores y metástasis. La terapia combinada proporcionada en la presente memoria activa la respuesta inmunitaria del anfitrión, mostrando así una eficacia antitumoral que produce como resultado una disminución o reducción del crecimiento del tumor, una disminución en el volumen del tumor y, en algunos casos, la eliminación o erradicación del tumor. Para los cánceres que se caracterizan por tener un alto contenido de HA, tal como el cáncer de páncreas, la terapia combinada proporciona beneficios significativos en comparación con la administración de una proteína de puntos de control inmunitario sola.

Por ejemplo, la terapia combinada se puede utilizar para tratar cualquier tumor, caracterizado por tener un contenido de HA de moderado a alto, tales como tumores de pulmón y bronquios, mama, colon y recto, riñón, estómago, esófago, hígado y conducto biliar intrahepático, vejiga urinaria, cerebro y otros del sistema nervioso, cabeza y cuello, cavidad bucal y faringe, cuello uterino, cuerpo uterino, tiroides, ovario, testículos, próstata, melanoma maligno, colangiocarcinoma, timoma, cáncer de piel distintos de melanoma, así como tumores y/o neoplasias malignas hematológicas, tales como leucemia y linfomas infantiles, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfomas de origen linfocítico y cutáneo, leucemia aguda y crónica, tal como leucemia linfoblástica aguda, mielocítica aguda o mielocítica crónica, neoplasia maligna de células plasmáticas, neoplasia maligna linfoide y cánceres asociados con SIDA, en donde el tumor tiene un contenido de HA de moderado a alto. Típicamente, la terapia combinada se utiliza para el tratamiento de tumores sólidos que tienen un contenido de HA de moderado (HA^{moderado} o HA^{+2}) a alto (HA^{alto} o HA^{+3}), por ejemplo, cánceres estromales con tumor sólido HA^{alto} . Los tumores con HA^{alto} ilustrativos incluyen, por ejemplo, tumores pancreáticos, tumores de ovario, tumores de pulmón, tumores de colon, tumores de próstata, tumores cervicales y tumores de mama.

En particular, los cánceres ricos en hialuronano elegidos como por la terapia combinada proporcionada son adecuados para ser atacados por un agente anti-hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano. Se han identificado varios cánceres ricos en hialuronano. Los tumores ricos en hialuronano incluyen, pero no se limitan a, tumores de próstata, mama, colon, ovario, estómago, cabeza y cuello y otros tumores y cánceres. En algunos casos, los niveles de hialuronano se correlacionan con un mal pronóstico, por ejemplo, una tasa de supervivencia reducida y/o una tasa de supervivencia sin recurrencia, metástasis, angiogénesis, invasión de células cancerosas en otros tejidos/áreas y otros indicadores de pronóstico desfavorable. Tal correlación se ha observado, por ejemplo, en tumores ricos en hialuronano que incluyen cáncer de ovario, CCE, CIS, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de páncreas (véanse, por ejemplo, Anttila et al., (2000) Cancer Research, 60:150-155.; Karvinen et al., (2003) British Journal of Dermatology, 148:86-94; Lipponen et al., (2001) Eur. Journal of Cancer, 849-856; Pirinen et al., (2001) Int. J. Cancer, 95:12-17; Auvinen et al., (2000) American Journal of Pathology, 156 (2):529-536; Ropponen et al., (1998) Cancer Research, 58:342-347). Por lo tanto, los cánceres ricos en hialuronano pueden tratarse mediante la administración de un agente antihialuronano, tal como una hialuronidasa, para tratar uno o más síntomas del cáncer.

En las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria, se pueden utilizar agentes anti-hialuronano, tales como enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo hialuronidasas, para potenciar las actividades antitumorales basadas en el sistema inmunológico promovidas por agentes terapéuticos que activan el sistema inmunológico. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano pueden mejorar la respuesta inmunitaria antitumoral de un anfitrión al facilitar el acceso de los inhibidores de puntos de control del sistema inmunológico, tales como los anticuerpos anti-proteína de puntos de control inmunitario, al sitio del tumor, facilitando la infiltración de las células inmunitarias y/o mejorando el contacto superficial entre las células inmunitarias citotóxicas y las células tumorales diana. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano, incluidas las hialuronidasas, tales como la rHuPH20, se pueden administrar a un paciente en una cantidad eficaz para aumentar la difusión alrededor del sitio del tumor (p. ej., para facilitar la circulación y/o las concentraciones de agentes inmunoterapéuticos y/o células inmunitarias en y alrededor del sitio del tumor), inhibir la motilidad de las células tumorales, por ejemplo mediante la degradación del ácido hialurónico, y/o disminuir el umbral de apoptosis de las células tumorales. Esto

puede llevar a las células tumorales a un estado de anoikis, lo que hace que las células tumorales sean más susceptibles a la lisis linfocítica y/o la acción de los agentes terapéuticos, incluidos los agentes terapéuticos adicionales.

5 En algunos ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano administrada aumenta el suministro de agentes terapéuticos (p. ej., inhibidores de puntos de control inmunitario) a los tumores al aumentar la difusión alrededor y dentro del sitio del tumor (p. ej., facilitando la circulación). (Patentes de Estados Unidos Núm. 7.767.429, 8.202.517, Publicación de Estados Unidos Núm. 2010-0003238). Por lo tanto, se puede administrar una enzima de degradación de hialuronano, tal como PH20, a un paciente en una cantidad eficaz para aumentar la difusión alrededor del sitio del tumor para mejorar el acceso de un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, administrado en combinación con (p. ej., después de) la enzima de degradación de hialuronano, en el sitio del tumor, donde puede activar las células inmunitarias, tales como los linfocitos, que residen en el tumor.

15 En otros ejemplos, los aumentos mediados por la enzima de degradación de hialuronano en la circulación alrededor y a través del sitio del tumor también pueden facilitar la infiltración de células inmunitarias, tales como los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), en el tumor (Singh et al., (2012) Clin Cancer Res. 18:B6; Singh et al., (2013) Cancer Res. 73 (8 Suplemento):4999). Por lo tanto, el agente o los agentes inhibidores de la proteína de puntos de control inmunitario, cuando se administran con la enzima de degradación de hialuronano, y generalmente después de la enzima de degradación de hialuronano, pueden activar las células inmunitarias que se han infiltrado en el tumor después de la degradación del hialuronano por la enzima de degradación de hialuronano, para efectuar una respuesta inmunitaria antitumoral.

25 En otros ejemplos, la degradación del hialuronano, por las enzimas de degradación de hialuronano, puede facilitar la lisis citotóxica linfocítica de las células cancerosas al mejorar el contacto superficial entre las células inmunitarias y las células tumorales diana (McBride y Bard (1979) J Exp Med. 149(2):507-515). Tal actividad además promueve una respuesta antitumoral como resultado de la administración de una terapia combinada proporcionada en la presente memoria.

30 **2. Selección de sujetos para tratamiento**

Los métodos para administrar una terapia combinada proporcionada en la presente memoria para el tratamiento del cáncer incluyen etapas para seleccionar sujetos para el tratamiento que tienen un tumor o cáncer que se caracteriza por tener un contenido de HA de moderado a alto. Tales métodos incluyen métodos para detectar los niveles de HA en los tumores de sujetos potenciales para identificar sujetos, con tumores caracterizados por un contenido de HA de moderado a alto que probablemente respondan al tratamiento de la administración combinada de un agente anti-hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano y un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario. Cualquier muestra o tejido de un sujeto puede ser analizada y comparada con una muestra o tejido normales. Los niveles de hialuronano se pueden medir a partir de cualquier fuente, tal como un tejido (p. ej., por biopsia), tumor, células o a partir de sangre, suero, orina u otros fluidos corporales. La elección de la muestra está dentro del nivel de un experto en la técnica.

En otros ejemplos, los sujetos seleccionados para el tratamiento muestran marcadores de una respuesta inmunitaria elevada existente. En algunos ejemplos, la respuesta inmunitaria elevada está indicada por un aumento en el recuento absoluto de linfocitos (ALC).

a. Medición del contenido de hialuronano en tumores

50 Está dentro del nivel de un experto en la técnica evaluar, cuantificar, determinar y/o detectar los niveles de hialuronano en una muestra. El contenido de hialuronano se puede medir, por ejemplo, en una muestra de tejido, célula o líquido recogida de un sujeto potencial. En ejemplos particulares, el contenido de hialuronano se mide en tejidos tumorales, por ejemplo en biopsias de tumores. Por ejemplo, tales métodos incluyen la inmunotinción por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia o ensayos de unión en fase sólida.

55 Los métodos de selección de sujetos según el grado de acumulación de hialuronano (p. ej., de moderado a alto) son conocidos en la técnica (véanse p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 2013/0202583; Jiang et al. (2012) Anticancer Res., 32:1203-1212; Kultti et al. (2012) Cancers, 4:873-903; y Jacobetz et al. (2012) Gut, 62:112-120). En tales métodos, se puede emplear una proteína de unión a hialuronano (HABP) para detectar hialuronano.

60 En un ejemplo adicional, la expresión y producción de hialuronano en células tumorales *in vitro* se puede determinar evaluando la producción de hialuronano sintasa (p. ej., HAS1, HAS2 o HAS3) y/o también se puede analizar la expresión por células *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, por ejemplo, mediante ELISA, SDS-PAGE, transferencia Western, PCR, RT-PCR, inmunohistoquímica, histología o citometría de flujo.

Los ensayos incluyen ensayos *in vitro* o *en vivo*. Los ensayos de unión ilustrativos que se pueden utilizar para valorar, evaluar, determinar, cuantificar y/o detectar de otra manera específicamente la expresión o los niveles de hialuronano en una muestra incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión en fase sólida (p. ej., ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoradiométrico, ensayo de fluorescencia, ensayo de quimioluminiscencia, ensayo bioluminiscente, transferencia Western e histoquímicos, tales como inmunohistoquímica (IHC) o pseudoinmunohistoquímica utilizando un agente de unión distinto de un anticuerpo. En los métodos de ensayo de unión en fase sólida, tales como los métodos ELISA, por ejemplo, el ensayo puede ser en formato sándwich o en formato de inhibición competitiva. En otros ejemplos, se pueden utilizar métodos de obtención de imágenes *in vivo*.

Se entiende que el cambio particular, p. ej., el aumento o la disminución de HA depende del ensayo utilizado. Por ejemplo, en un ELISA, el aumento o disminución de la absorbancia a una longitud de onda particular o de la cantidad de proteína (p. ej., según lo determinado mediante el uso de una curva patrón) se puede expresar en relación con un control. En un ensayo de PCR, tal como RT-PCR, el cambio se puede comparar con los niveles de expresión de control (p. ej., expresado como multiplicidad de cambio) utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como el uso de patrones.

Por ejemplo, cuando se está sometiendo a prueba la cantidad de hialuronano en una muestra de un sujeto, la detección del marcador puede determinar que la cantidad de HA en la muestra (p. ej., células cancerosas, tejido o fluido) del sujeto se eleva en comparación con una muestra de control, como una muestra de control descrita en el párrafo anterior. En un ejemplo, se determina que el cáncer es rico en hialuronano si la cantidad de HA en el tejido, la célula o el fluido se eleva o se eleva aproximadamente 0,5 veces, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 20 veces, o más, en comparación con la muestra de control. Por ejemplo, los tumores con HA alto generalmente muestran al menos 2 veces más de HA o más que una muestra de control (p. ej., tumor). La muestra de control puede ser la muestra tratada con una hialuronidasa para digerir el AH y confirmar la especificidad de la tinción. En otros casos, la muestra de control puede incluir, pero no se limita a, un fluido, tejido, extracto (p. ej., extracto celular o nuclear), ácido nucleico o preparación de péptidos, línea celular, biopsia, muestra patrón u otra muestra, con una cantidad conocida o una cantidad relativa de HA, tal como una muestra, por ejemplo una línea de células tumorales, que se sabe que expresa niveles relativamente bajos de HA, tales como las líneas celulares tumorales ilustrativas descritas en la presente memoria que expresan niveles bajos de HA, por ejemplo, la línea celular HCT 116, la línea celular HT29, la línea celular NCI H460, la línea celular DU145, la célula Capan-1 línea, y tumores a partir de modelos de tumores generados utilizando tales líneas celulares.

i. Proteínas de unión a hialuronano (HABP)

Los sujetos se pueden seleccionar mediante la detección de la unión de una HABP (también conocida como hialadherinas) a una muestra. La HABP puede ser una proteína de unión a ácido hialurónico del cartílago nasal bovino (p. ej., HABP disponible comercialmente de EMD Millipore, Billerica, MA con el Núm. de Catálogo 385911). La HABP también puede ser cualquier proteína que contenga un módulo de conexión o dominios G1, que son dominios que se sabe que se unen al hialuronano, o multímeros de los mismos que contienen dos o más de tales dominios. Tales proteínas son conocidas y se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2013/0202583. Un ejemplo de tal proteína es TSG-6 o el módulo de conexión de TSG-6 (TSG-6-LM), o variantes de los mismos que muestran una unión reducida a la heparina, o multímeros de los mismos. Para la detección, la HABP puede ser marcada de manera detectable. Por ejemplo, la HABP puede ser biotinilada.

En ejemplos particulares, la HABP es un multímero como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2013/0202583. Un multímero HABP es una molécula de unión que contiene al menos dos sitios o dominios de unión a HA (p. ej., al menos dos módulos de conexión) que son capaces de unirse a HA. Por lo tanto, un multímero típicamente tiene una afinidad de unión, cuando se representa como la constante de disociación (Kd), que es generalmente menor que 1×10^{-8} M a 1×10^{-10} M, tal como menor de 9×10^{-9} M, 8×10^{-9} M, 7×10^{-9} M, 6×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 4×10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 2×10^{-9} M, 1×10^{-9} M, 9×10^{-10} M, 8×10^{-10} M, 7×10^{-10} M, 6×10^{-10} M, 5×10^{-10} M, 4×10^{-10} M, 3×10^{-10} M, 2×10^{-10} M, 1×10^{-10} M o una Kd menor.

El multímero se puede formar a partir de una proteína de fusión que contiene un sitio de unión a HA (p. ej., dominio G1 o módulo de conexión) ligado directa o indirectamente a un dominio de multimerización. El dominio de multimerización proporciona la formación de una interacción proteína-proteína estable entre el dominio de multimerización de un primer polipéptido de HABP y el dominio de multimerización de un segundo polipéptido de HABP. El primer y segundo polipéptidos de HABP (p. ej., que contienen un dominio de conexión o dominio G1) pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el multímero se puede formar por la expresión de la proteína de fusión en una célula. Las proteínas quiméricas del dominio de multimerización de HABP resultantes se pueden expresar en células anfitrionas transformadas con el vector de expresión recombinante, y se pueden ensamblar en multímeros, donde los dominios de multimerización interactúan para formar polipéptidos multivalentes. El enlace químico de los dominios de multimerización a polipéptidos HABP se puede efectuar utilizando conectores heterobifuncionales como

se comentó anteriormente.

Los polipéptidos quiméricos resultantes, y los multímeros formados a partir de ellos, se pueden purificar mediante cualquier método adecuado tal como, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de Proteína A o Proteína G. Cuando dos moléculas de ácido nucleico que codifican diferentes polipéptidos quiméricos de HABP se transforman en células, se producirá la formación de homo y heterodímeros. Las condiciones de expresión se pueden ajustar de modo que se favorezca la formación de heterodímeros sobre la formación de homodímeros.

Un ejemplo de HABP es TSG-6, o un polipéptido que contiene un módulo de conexión de TSG-6 (es decir, TSG-6-LM), una porción suficiente de un módulo de conexión para unirse a HA, variantes del mismo o un multímero del mismo. El gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral (TSG-6, proteína 6 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa, TNFAIP6; SEQ ID NO: 303) es una glicoproteína secretada de ~35 kDa compuesta de un único módulo de conexión N-terminal y un dominio CUB C-terminal. La expresión de TSG-6 es inducida en muchos tipos de células por mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas y factores de crecimiento. A través de su módulo de conexión, TSG-6 es un potente inhibidor de la migración de leucocitos polimorfonucleares. TSG-6 forma un complejo estable con el inhibidor de la serina proteasa Inhibidora Inter-alfa (I α I) y potencia la actividad anti-plasmina de I α I. TSG-6 también es importante para la formación y remodelación de capas pericelulares y matrices extracelulares ricas en HA.

El transcrito de TSG-6 humano (SEQ ID NO: 302) se traduce normalmente para formar un péptido precursor de 277 aminoácidos (SEQ ID NO: 303) que contiene una secuencia señal de 17 aminoácidos en el extremo N-terminal. El TSG-6 maduro (expuesto en SEQ ID NO: 304), por lo tanto, es una proteína de 260 aminoácidos que contiene los aminoácidos 18-277 de SEQ ID NO: 303 (Lee et al. (1992) J Cell Biol 116:545-557). TSG-6 se compone de dos dominios principales, el módulo de conexión y el dominio CUB. Se ha referido de diversas maneras en la bibliografía que el módulo de conexión de TSG-6 se encuentra en los aminoácidos 35-129, 36-128, 36-129 o 36-132 de SEQ ID NO: 303 (expuestos como SEQ ID NO: 305, 306, 307 o 308, respectivamente). Se entiende que la referencia a los loci de un dominio puede variar en varios aminoácidos debido a las diferencias en los alineamientos. Por lo tanto, para los fines de la presente memoria, un TSG-6-LM es uno expuesto en cualquiera de SEQ ID NO: 305-308 o que varía de tal secuencia en uno, dos o tres aminoácidos. El dominio CUB está ubicado en los aminoácidos 135-246 de SEQ ID NO: 303. El TSG-6 humano tiene dos glicanos unidos a N potenciales en los residuos N118 y N258 de SEQ ID NO: 303. Además, los residuos T259 y T262 de SEQ ID NO: 303 están fosforilados (Molina et al. (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104:2199-2204). El TSG-6 humano tiene ocho cisteínas nativas que forman cuatro enlaces disulfuro en los residuos C58-C127, C82-C103, C135-C161 y C188-C210 de la preproteína TSG-6 (SEQ ID NO: 303).

El módulo de conexión TSG-6 (p. ej., SEQ ID NO: 305-308) tiene un tamaño relativamente pequeño y una estructura bien caracterizada. Se determinó que la estructura tridimensional del dominio de enlace TSG-6 tiene el mismo plegamiento que otros módulos de conexión conocidos, que contienen dos hélices alfa y dos láminas beta antiparalelas dispuestas alrededor de un gran núcleo hidrófobo (Kohda et al. (1996) Cell 86:767-775). Además, se ha estudiado la interacción del módulo de conexión de TSG-6 y HA revelando que los anillos aromáticos de Tyr12, Tyr59, Phe70, Tyr78, Trp88 y los residuos alcalinos Lys11, Lys72, Asp77, Arg 81 y Glu86 del dominio de conexión de TSG-6 (SEQ ID NO: 305) son importantes para la unión a HA (véanse, p. ej., Kahmann et al. (2000) Structure 15: 763-774; Mahoney et al. (2001) J Biol Chem 276:22764-22771; Kohda et al. (1996) Cell, 88:767-775.; Blundell et al. (2003) J Biol Chem 278:49261-49270; Lesley et al. (2004) J Biol Chem 279:25745-25754; Blundell et al. (2005) J Biol Chem 280:18189-18201). Los estudios estructurales también muestran que solo hay un único sitio de unión a HA contenido en el módulo de conexión, que se localiza en una región de la molécula en función del mapa estructural de los residuos Lys11, Tyr12, Tyr59, Phe70 y Tyr78 que están más directamente implicados en la unión de HA (véase p. ej., Mahoney et al. (2001) J Biol Chem 276:22764-22771).

El módulo de conexión de TSG-6 muestra actividad de unión a varios glicosaminoglicanos. Por ejemplo, los estudios han revelado la unión del módulo de conexión a HA, condroitin-4-sulfato (C4S), dominio G1 del proteoglicano agregano, heparina y la cadena de bikunina de I α I (véase p. ej., Milner et al. (2003) Journal of Cell Science, 116:1863-1873; Mahoney et al. (2005) Journal of Biological Chemistry, 280:27044-27055). La unión de TSG-6 a heparina y HA está mediada por un sitio de unión distinto en la LM de TSG-6. Los residuos involucrados en la unión de TSG-6-LM a hialuronano son Lys11, Tyr12, Tyr59, Phe70 y Tyr78, por lo que los mutantes K11Q, Y12F, Y59F, F70V y Y78F tienen entre 10 y 100 veces menos afinidad de unión a HA en comparación con el tipo salvaje; los residuos de TSG-6-LM implicados en la unión a heparina son Lys20, Lys34, Lys41, Lys54, Arg56 y Arg84, por lo que los mutantes K20A, K34A, K41A y K54A muestran propiedades de unión a heparina deterioradas; y los residuos implicados en la unión de TSG-6-LM a bikunina se superponen pero no son idénticos al sitio de unión de HA (Mahoney et al. (2005) Journal of Biological Chemistry, 280:27044-27055).

La unión de TSG-6 a hialuronano es dependiente del pH, con una actividad de unión mostrada a un pH ácido de 5,6 a 6,4 o a un pH ácido de aproximadamente 5,6 a 6,4, tal como un pH de 5,8 a 6,0 o un pH de aproximadamente 5,8 a pH 6,0.

Los polipéptidos TSG-6, sus dominios de unión a HA, p. ej., los módulos de conexión a TSG-6, o los fragmentos de

los mismos suficientes para unirse a HA proporcionados en la presente memoria para su uso como un diagnóstico complementario pueden incluir cualquiera de SEQ ID NO: 303-308, o variantes de los mismos, tales como variantes que muestren al menos 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOS: 303-308. Las variantes ilustrativas incluyen, por ejemplo, variantes de especies, variantes alélicas y variantes que contienen mutaciones de aminoácidos conservativas y no conservativas. Las variantes alélicas naturales de TSG-6 humano incluyen, por ejemplo, TSG-6 que contiene el reemplazo de aminoácido Q144R (Nentwich et al. (2002) J Biol Chem 277:15354-15362). TSG-6 está altamente conservado entre las especies siendo las proteínas humanas y de ratón > 94% idénticas.

Las variantes de TSG-6 o fragmentos de unión a HA del mismo para su uso en los métodos proporcionados incluyen variantes con una modificación de aminoácido que sea un reemplazo de aminoácido (sustitución), delección o inserción. Las modificaciones ilustrativas son reemplazos de aminoácidos tales como un reemplazo de aminoácidos en cualquiera de los residuos de aminoácido 4, 6, 8, 13, 20, 29, 34, 41, 45, 54, 67, 72 o 96 correspondientes a los residuos de TSG-6 expuestos en SEQ ID NO: 305. El aminoácido de reemplazo puede ser cualquier otro residuo de aminoácido. Los reemplazos de aminoácidos ilustrativos de un polipéptido TSG-6 o fragmentos de unión a HA del mismo proporcionados en la presente memoria para su uso como reactivo de diagnóstico complementario incluyen polipéptidos TSG-6 modificados o fragmentos de unión a HA de los mismos que contienen al menos un reemplazo de aminoácido correspondiente a H4K, H4S, E6A, E6K, R8A, K13A, K20A, H29K, K34A, K41A, H45S, K54A, N67L, N67S, K72A, H96K, K34A/K54A o K20A/K34A/K41A correspondiente a los residuos de TSG-6 expuestos en SEQ ID NO: 305 (véanse, p. ej., Mahoney et al. (2005) J Biol Chem 280:27044-27055, Blundell et al. (2007) J Biol Chem 282:12976-12988, Lesley et al. (2004) J Biol Chem 279:25745-25754, Kahmann et al. (2000) Structure 15:763-774). Se entiende que los residuos importantes o requeridos de otro modo para la unión de TSG-6 a HA, tales como los descritos anteriormente o conocidos por un experto en la técnica, son generalmente invariables y no se pueden cambiar. Así, por ejemplo, los residuos de aminoácidos 11, 12, 59, 70, 78 y 81 de SEQ ID NO: 305 en el módulo de conexión de TSG-6 son generalmente invariables y no están alterados. Además, se entiende que las modificaciones de aminoácidos que dan como resultado un plegamiento incorrecto o una perturbación del plegado del módulo de conexión son generalmente invariables. Así, por ejemplo, un TSG-6 modificado no contendrá una cualquiera o más de las modificaciones de aminoácidos H4S, H29A, H45A, H45K, R56A, D77A, R84A y D89A de SEQ ID NO: 305 (Mahoney et al. (2005) J Biol Chem 280:27044-27055, Blundell et al. (2007) J Biol Chem 282:12976-12988, Lesley et al. (2004) J Biol Chem 279:25745-25754).

En particular, la modificación, por ejemplo, reemplazo o reemplazos de aminoácidos, es aquella que confiere una actividad alterada, tal como mejorada, en comparación con un TSG-6 que no contiene la modificación. Tales variantes incluyen aquellas que contienen modificaciones de aminoácidos que mejoran la afinidad de unión de TSG-6 a HA, aumentan la especificidad de TSG-6 para HA, y/o aumentan la solubilidad de TSG-6. Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan para el uso en la presente memoria variantes de TSG-6, dominios de unión a HA, o porciones de los mismos suficientes para unirse a HA que aumentan la especificidad de TSG-6 para HA al disminuir la unión de TSG-6 a otros glicosaminoglicanos incluyendo heparina, condroitin-4-sulfato, sulfato de heparano y sulfato de dermatán. La unión al otro glicosaminoglicano que no es hialuronano se puede reducir al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces o más en comparación con la unión de TSG-6-LM que no contiene la modificación. Por ejemplo, en la presente memoria se proporciona un TSG-6-LM mutante que contiene uno o más reemplazos de aminoácidos en los residuos de aminoácidos 20, 34, 41, 54, 56, 72 y/u 84, y en particular en los residuos de aminoácidos 20, 34, 41 y/o 54 (correspondientes a los residuos de aminoácidos expuestos en SEQ ID NO: 303). El aminoácido de reemplazo puede ser a cualquier otro residuo de aminoácido, y generalmente es a un residuo de aminoácido no alcalino. Por ejemplo, el reemplazo de aminoácidos puede ser Asp (D), Glu (E), Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q), Ala (A), Val (V), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Tyr (Y) o Trp (W). El reemplazo o reemplazo de aminoácidos confiere una menor unión a la heparina. Por ejemplo, las variantes que disminuyen la capacidad de TSG-6 para unirse a heparina son conocidas por los expertos en la técnica. Tales variantes son aquellas que incluyen al menos una mutación correspondiente a K20A, K34A, K41A y K54A, incluidas las variantes K34A/K54A o K20A/K34A/K41A (Mahoney et al. (2005) J Biol Chem 280:27044-27055). Las variantes ilustrativas que disminuyen o reducen la unión a la heparina son la variante TSG-6-LM expuesta en SEQ ID NO: 309 o 310.

Un ejemplo de polipéptido TSG-6 como un diagnóstico complementario es un polipéptido TSG-6 que contiene al menos un dominio de unión a HA, por ejemplo, un módulo de conexión de TSG-6. Por lo tanto, en la presente memoria se proporciona un módulo de conexión de TSG-6, o una variante del mismo, para su uso en los métodos proporcionados. Un ejemplo de un reactivo polipeptídico de este tipo es uno que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 305-310, o tiene una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 305-310. Por ejemplo, el módulo de conexión de TSG-6 se puede modificar para alterar su especificidad, afinidad o solubilidad, siempre que mantenga su capacidad de unirse a HA.

En otro ejemplo más, la afinidad del módulo de conexión de TSG-6 se incrementa mediante la dimerización o la multimerización, tal como, por ejemplo, la fusión a un dominio de multimerización, tal como un dominio Fc. Por lo

tanto, el módulo de conexión de TSG-6 se puede modificar para producir un multímero que contenga dos o más módulos de conexión que estén vinculados directa o indirectamente a través de un dominio de multimerización para efectuar la formación de moléculas de dímero o trímero y la generación de múltiples sitios de unión a HA. Por ejemplo, un diagnóstico complementario es aquél que se genera mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el módulo de conexión expuesto en una de SEQ ID NO: 305-310 o un ácido nucleico que codifica un módulo de conexión que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 84%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 305-310 unida directa o indirectamente a un ácido nucleico que codifica un dominio de multimerización, tal como una porción Fc de una inmunoglobulina. Por lo tanto, el multímero de TSG-6-LM resultante contiene un primer polipéptido expuesto en uno de SEQ ID NO: 305-310 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 84 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 305-310 unida directa o indirectamente a un dominio de multimerización; y un segundo polipéptido expuesto en uno cualquiera de SEQ ID NO: 305-310 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 84%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 305-310 unida directa o indirectamente a un dominio de multimerización. En general, el LM o una porción suficiente del mismo para efectuar la unión de HA es la única porción de TSG-6 del multímero.

Los ejemplos de polipéptidos quiméricos de HABP-Fc incluyen la proteína de fusión del módulo de conexión TSG-6 (TSG-6-LM) y Fc. Por ejemplo, la molécula TSG-6-LM:Fc puede ser una expuesta en SEQ ID NO: 312 o 313. Una TSG-6-LM-Fc ilustrativa se expone en SEQ ID NO: 312, y está codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 314 o 316. Una TSG-6-LM-Fc ilustrativa se expone en SEQ ID NO: 313, y está codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 315. Además las moléculas de HABP-Fc, que incluyen, por ejemplo, las moléculas de TSG-6-Fc ilustrativas, pueden contener opcionalmente una etiqueta epitópica o una señal de expresión y secreción. Por ejemplo, el polipéptido quimérico TSG-6-LM-Fc ilustrativo expuesto como SEQ ID NO: 312 contiene la secuencia del péptido señal líder de la cadena ligera kappa (κ) de la inmunoglobulina humana, un fragmento Fc de la cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 311) y un módulo de conexión TSG-6 humano (SEQ ID NO: 306). La secuencia de ADNc que codifica el polipéptido quimérico TSG-6-LM-Fc se expone en SEQ ID NO: 314.

ii. Métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos

Los niveles de hialuronano en una muestra recogida, tal como una muestra de un tumor, se pueden medir en función de la capacidad de una HABP para unirse a HA en una muestra y detectar la HABP, de modo que la cantidad del diagnóstico complementario de la HABP se correlaciona con la cantidad de HA en la muestra. Se puede utilizar cualquier diagnóstico complementario de HABP para detectar HA utilizando métodos de tinción de tejidos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, métodos citoquímicos o histoquímicos, tales como inmunohistoquímica (IHC) o histoquímica utilizando un agente de unión distinto de un anticuerpo (p. ej., pseudo-inmunohistoquímica). Tales métodos histoquímicos permiten la detección cuantitativa o semicuantitativa de la cantidad de HABP que se une a HA en una muestra, tal como una muestra de tejido tumoral. En tales métodos, se puede poner en contacto una muestra de tejido con un reactivo HABP proporcionado en la presente memoria, y en particular uno que esté marcado de forma detectable o que se pueda detectar, en condiciones que permitan la unión al HA asociado con el tejido o la célula.

Una muestra para determinar los niveles de HA por histoquímica puede ser cualquier muestra biológica que pueda analizarse para determinar sus niveles de HA, tal como un tejido, tal como un tejido tumoral o una muestra celular. Por ejemplo, una muestra de tejido puede ser tejido sólido, incluyendo una muestra de órgano o tejido fresco, congelado y/o conservado o biopsia o producto aspirado, o células. En algunos ejemplos, la muestra de tejido es tejido o células obtenidos de un tumor sólido, tal como tumores primarios y metastásicos, que incluyen, pero no se limitan a, tumores de mama, colon, recto, pulmón, estómago, ovario, cuello uterino, útero, testículos, vejiga, próstata, tiroides y pulmón. En ejemplos particulares, la muestra es una muestra de tejido de un cáncer en estadio tardío, cáncer metastásico, cáncer no diferenciado, cáncer de ovario, carcinoma in situ (CIS), carcinoma de células escamosas (CCE), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de colon. En otros ejemplos, la muestra de tejido contiene células de células o líneas celulares primarias o cultivadas. Las células pueden tener diversos estados de diferenciación y pueden ser normales, precancerosas o cancerosas, pueden ser tejidos frescos, células dispersas, células inmaduras, incluyendo células madre, células de madurez intermedia y células completamente maduras. Típicamente, las células seleccionadas para su uso en los métodos proporcionados en la presente memoria son células cancerosas.

Cuando el tumor es un tumor sólido, el aislamiento de las células tumorales se logra típicamente mediante biopsia quirúrgica. Las técnicas de biopsia que se pueden utilizar para extraer células tumorales de un sujeto incluyen, pero no se limitan a, biopsia con aguja, biopsia con aguja guiada por TC, biopsia por aspiración, biopsia endoscópica, biopsia broncoscópica, lavado bronquial, biopsia incisional, biopsia por escisión, biopsia por punción, biopsia por afeitado, biopsia de piel, biopsia de médula ósea y el Procedimiento de Extirpación Electroquirúrgico de Lazo

(LEEP). Típicamente, se obtiene una biopsia o espécimen no necrótico, estéril que es mayor que 100 mg, pero que puede ser más pequeño, tal como por ejemplo menos de 100 mg, 50 mg o menos, 10 mg o menos o 5 mg o menos; o más grande, tal como más de 100 mg, 200 mg o más, o 500 mg o más, 1 g o más, 2 g o más, 3 g o más, 4 g o más o 5 g o más. El tamaño de la muestra que se extraerá para el ensayo puede depender de una serie de factores que incluyen, pero no se limitan a, el número de ensayos que se realizarán, la salud de la muestra de tejido, el tipo de cáncer y el estado del sujeto. El tejido tumoral se coloca en un recipiente estéril, tal como un tubo o placa de cultivo estériles, y se puede sumergir opcionalmente en un medio apropiado.

El tejido obtenido del paciente después de la biopsia a menudo se fija, generalmente por medio de inmersión en formalina (formaldehído) o glutaraldehído, por ejemplo, o en alcohol. Para los métodos histoquímicos, la muestra de tumor se puede procesar utilizando técnicas conocidas, tales como la deshidratación e inclusión del tejido tumoral en una cera de parafina u otros soportes sólidos conocidos por los expertos en la técnica (véase Plenat et al., (2001) Ann Pathol January 21(1):29-47), cortando el tejido en secciones adecuadas para la tinción, y procesando las secciones para la tinción de acuerdo con el método de tinción histoquímica seleccionado, incluyendo la eliminación de soportes sólidos para la inclusión con disolventes orgánicos, por ejemplo, y la rehidratación del tejido conservado. Por lo tanto, las muestras para su uso en los métodos de la presente memoria pueden contener compuestos que no están presentes de forma natural en una muestra de tejido o celular, incluyendo, por ejemplo, conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes y antibióticos.

En los métodos ilustrativos para seleccionar un sujeto para el tratamiento con una enzima de degradación de hialuronano, la recogida del tejido tumoral se realiza generalmente antes del tratamiento del sujeto con una enzima de degradación de hialuronano. En métodos ilustrativos de seguimiento de la terapia de un tumor con una enzima de degradación de hialuronano, la recogida del tejido tumoral del sujeto se puede realizar antes, durante o después de que el sujeto haya recibido uno o más tratamientos con una enzima de degradación de hialuronano.

Los ensayos para medir el HA presente en una muestra realizan la detección mediante histoquímica o inmunohistoquímica. La histoquímica (HC) es un método de tinción basado en reacciones enzimáticas que utilizan un compañero de unión, tal como un anticuerpo (p. ej., anticuerpos monoclonales o policlonales) u otro compañero de unión, para detectar células o proteínas específicas tales como antígenos de tejidos o biomarcadores, por ejemplo, HA. Por ejemplo, los ensayos de histoquímica incluyen aquellos en los que se utiliza una HABP como un compañero de unión para detectar el AH asociado con células o tejidos, particularmente tejidos de cáncer. Por lo general, los protocolos de histoquímica incluyen sistemas de detección que hacen visible la presencia de los marcadores, ya sea a simple vista o en un sistema de detección automático, para análisis cualitativos o cuantitativos. En un ensayo directo de HC, la unión se determina directamente después de la unión del compañero de unión (p. ej., primer anticuerpo) al tejido o biomarcador debido al uso de un reactivo marcado. En un ensayo de HC indirecto, es necesario un anticuerpo secundario o segundo compañero de unión para detectar la unión del primer compañero de unión, ya que éste no está marcado.

En tales métodos, generalmente una muestra de tejido montada en un portaobjetos se tiñe con un reactivo de unión marcado (p. ej., HABP marcada) utilizando técnicas comunes de histoquímica. De este modo, en algunos ensayos de HC, la HABP o el anticuerpo anti-HA se modifican para que contengan un radical detectable, tal como una proteína fluorescente, una proteína bioluminiscente o una enzima. En algunos ejemplos, la HABP o el anticuerpo anti-HA se conjugan con una molécula pequeña, p. ej., biotina, que se detecta a través de un compañero de unión o anticuerpo marcados. En algunos ejemplos, el método de IHC se basa en la tinción con una HABP o anticuerpo que se detectan mediante tinción enzimática con peroxidasa de rábano picante. Por ejemplo, la HABP o el anticuerpo anti-HA pueden ser biotinilados y detectados con avidina o estreptavidina conjugadas con proteínas detectables, tales como la estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. En otros ejemplos, la HABP o el anticuerpo anti-HA se conjugan con proteínas detectables que permiten la detección directa, tal como, por ejemplo, el diagnóstico complementario de HABP conjugada con una proteína fluorescente, una proteína bioluminiscente o una enzima. Se conocen diversos métodos de tinción enzimática en la técnica para detectar una proteína de interés. Por ejemplo, las interacciones enzimáticas se pueden visualizar utilizando diferentes enzimas tales como la peroxidasa, la fosfatasa alcalina o diferentes cromógenos tales como DAB, AEC o Fast Red. En otros ejemplos, los diagnósticos complementarios de HABP se conjugan con péptidos o proteínas que se pueden detectar a través de un compañero de unión o anticuerpo marcados.

Se toman imágenes de cada uno de los especímenes teñidos resultantes utilizando un sistema para visualizar la señal detectable y obtener una imagen, tal como una imagen digital de la tinción. Los métodos para la obtención de imágenes son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una vez que la muestra se ha teñido, se puede utilizar cualquier dispositivo de obtención de imágenes óptico o no óptico para detectar el colorante o la marca biomarcadora, tal como, por ejemplo, microscopios ópticos verticales o invertidos, microscopios confocales de barrido, cámaras, microscopios electrónicos de barrido o de efecto túnel, microscopios de sonda de barrido y detectores infrarrojos de imágenes.

En algunos ejemplos, la imagen puede ser capturada digitalmente. Las imágenes obtenidas se pueden utilizar a

continuación para determinar cuantitativamente o semicuantitativamente la cantidad de HA en la muestra. En la técnica se encuentran disponibles diversos sistemas automatizados de procesamiento, barrido y análisis de muestras adecuados para su uso con la inmunohistoquímica. Tales sistemas pueden incluir tinción automática y barrido microscópico automatizados, análisis computarizado de imágenes, comparación de secciones en serie (para controlar la variación en la orientación y el tamaño de una muestra), generación de informes digitales y archivo y rastreo de muestras (tales como portaobjetos sobre los que se colocan secciones de tejido).

Los sistemas de obtención de imágenes celulares están disponibles comercialmente y combinan los microscopios ópticos convencionales con los sistemas de procesamiento de imágenes digitales para realizar análisis cuantitativos en células y tejidos, incluyendo las muestras inmunoteñidas. Véase, p. ej., el sistema CAS-200 (Becton, Dickinson & Co.). En particular, la detección se puede realizar manualmente o mediante técnicas de procesamiento de imágenes con procesadores y soporte lógico informáticos. Al utilizar dicho soporte lógico, por ejemplo, las imágenes se pueden configurar, calibrar, normalizar y/o validar basándose en factores que incluyen, por ejemplo, la calidad de la tinción o la intensidad de la tinción, utilizando procedimientos conocidos por un experto en la técnica (véase p. ej., la Publicación de la Patente de Estados Unidos Núm. US20100136549).

La imagen se puede analizar cuantitativa o semicuantitativamente y se puede calificar según la intensidad de tinción de la muestra. La histoquímica cuantitativa o semicuantitativa se refiere al método de exploración y puntuación de las muestras que se han sometido a histoquímica para identificar y cuantificar la presencia de un biomarcador específico, tal como un antígeno u otra proteína (p. ej., HA). Los métodos cuantitativos o semicuantitativos pueden emplear soporte lógico para la obtención de imágenes para detectar densidades de tinción o cantidades de tinción o métodos de detección de tinción a simple vista, donde un operador entrenado clasifica los resultados numéricamente. Por ejemplo, las imágenes se pueden analizar cuantitativamente utilizando algoritmos de conteo de píxeles (p. ej., Aperio Spectrum Software, Plataforma Automated QUantitative Analysis (plataforma AQUA®) y otros métodos convencionales que miden o cuantifican o semi-cuantifican el grado de tinción; véanse p. ej., Patente de Estados Unidos Núm. 8.023.714; Patente de Estados Unidos Núm. 7.257.268; Patente de Estados Unidos Núm. 7.219.016; Patente de Estados Unidos Núm. 7.646.905; Solicitudes de Patente de Estados Unidos Publicadas Núm. US20100136549 y 20110111435; Camp et al. (2002) *Nature Medicine*, 8:1323-1327; Bacus, et al., (1997) *Analyt Quant Cytol Histol*, 19:316-328). Se puede calcular y puntuar una razón de tinción positiva fuerte (tal como una tinción de color pardo) para la suma del área total teñida.

Utilizando métodos histoquímicos, tales como los métodos inmunohistoquímicos o pseudoinmunohistoquímicos, la cantidad de HA detectada se cuantifica y se administra como un porcentaje de píxeles positivos para HA y/o una puntuación. La puntuación particular para seleccionar un tumor que exprese hialuronano de moderado a alto se puede determinar empíricamente, por ejemplo basándose en criterios publicados o conocidos para evaluar tumores para HA. En general, una línea celular tumoral conocida por expresar en exceso HA (tal como el tejido tumoral de xenoinjerto PC3 o los tumores generados para expresar en exceso HA mediante la expresión de los genes HAS2 o HAS3) puede servir como tejido de control positivo para determinar el umbral de intensidad para la cantidad de píxeles positivos. La tinción de HA también se puede confirmar mediante la digestión de un subconjunto de secciones con una hialuronidasa antes de la adición de la HABP.

Por ejemplo, la cantidad de HA detectada en la muestra se puede cuantificar como un porcentaje de píxeles positivos para HA. En algunos ejemplos, la cantidad de HA presente en una muestra se cuantifica como el porcentaje de área teñida, p. ej., el porcentaje de píxeles positivos para HA. Por ejemplo, una muestra puede tener al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 0, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 95% o más píxeles positivos para HA en comparación con el área de tinción total.

En algunos ejemplos, se otorga una puntuación a la muestra que es una representación numérica de la intensidad o la cantidad de tinción histoquímica de la muestra y representa la cantidad de biomarcador diana (p. ej., HA) presente en la muestra. A los valores de densidad óptica o área de porcentaje se les puede dar una puntuación a escala, por ejemplo, en una escala de números enteros, por ejemplo, 0-10, 0-5 o 0-3. En ejemplos particulares, la cantidad de hialuronano en una muestra se clasifica en una escala de 0-3, p. ej., 0, HA+1 (bajo), HA+ (moderado) y HA+3 (alto). La cantidad de HA presente es relativa al porcentaje de píxeles de HA, es decir, los porcentajes bajos de píxeles de HA indican un nivel bajo de HA, mientras que los porcentajes altos de píxeles de HA indican niveles altos de HA. Las puntuaciones se pueden correlacionar con los porcentajes de píxeles positivos para HA, de modo que el área de porcentaje que se tiñe se puntúa como 0, HA+1, HA+2 y HA+3, que representan ausencia de tinción, menos de 10% de tinción, 10-25% de tinción o más de 25% de tinción, respectivamente. Por ejemplo, si la razón (p. ej., la tinción de píxeles fuerte con respecto al área total teñida) es superior a 25%, el tejido tumoral se califica como HA+3, si la razón es de 10-25% de la tinción positiva fuerte con respecto a la tinción total, el tejido tumoral se puntúa como HA+2, si la razón es de menos de 10% de tinción positiva fuerte con respecto a la tinción total, el tejido tumoral se califica como HA+1, y si la razón de tinción positiva fuerte con respecto a la tinción total es 0, el tejido tumoral se puntúa como 0. Una puntuación de 0 o HA+1 indica niveles bajos de HA en la muestra sometida a prueba, mientras

que una puntuación de HA+2 o HA+3 indica niveles de moderados a altos de HA en las muestras sometidas a prueba.

iii. Ensayos de unión en fase sólida

Los ensayos de unión en fase sólida también se pueden utilizar para determinar cuantitativa o semicuantitativamente la cantidad de HA en una muestra. Los ejemplos de ensayos de unión en fase sólida que se pueden utilizar para valorar, evaluar, determinar, cuantificar y/o detectar de otra manera específicamente la expresión o los niveles de hialuronano en una muestra incluyen, pero no se limitan a, ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoradiométrico, ensayo fluorométrico, ensayo quimioluminiscente, ensayo bioluminiscente. Por ejemplo, se puede emplear una HABP o un anticuerpo anti-HA para detectar HA utilizando cualquier ensayo de unión en fase sólida conocido por un experto en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, el ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) u otro inmunoensayo similar, incluyendo un ELISA tipo sándwich o un ensayo ELISA competitivo. Los métodos ilustrativos proporcionados en la presente memoria incluyen métodos basados en ELISA para la detección cuantitativa o semicuantitativa de la cantidad de HABP que se une al HA en una muestra, tal como una muestra de tejido tumoral o una muestra de fluido de un sujeto que tiene un tumor o se sospecha que tiene un tumor. El uso de ensayos de unión en fase sólida se puede utilizar cuando se detecta HA en un fluido corporal.

Los pacientes que muestran altos niveles de producción de hialuronano en el tejido tumoral también muestran altos niveles de hialuronano en sangre y otras muestras de fluidos. Las muestras de fluidos para el análisis de la producción de HA en una enfermedad asociada con HA, tal como el cáncer, incluyen, pero no se limitan a, suero, orina, plasma, líquido cefalorraquídeo y linfa. El sujeto puede tener o ser sospechoso de tener un cáncer, tal como tumores primarios y metastásicos, en la mama, colon, recto, pulmón, estómago, ovario, cuello uterino, útero, testículos, vejiga, próstata, tiroides, cáncer de pulmón. En ejemplos particulares, el cáncer es un cáncer de estadio tardío, un cáncer metastásico, un cáncer indiferenciado, un cáncer de ovario, un carcinoma in situ (CIS), un carcinoma de células escamosas (CCE), un cáncer de próstata, un cáncer de páncreas, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, o cáncer de colon.

En métodos ilustrativos para seleccionar sujetos para el tratamiento, la recogida de una muestra de fluido de un sujeto se realiza generalmente antes del tratamiento del sujeto según se proporciona en la presente memoria. En métodos ilustrativos de seguimiento de la terapia de un tumor con una enzima de degradación de hialuronano, la recogida de la muestra de fluido de un sujeto se puede realizar antes, durante o después de que el sujeto haya recibido uno o más tratamientos con una enzima de degradación de hialuronano. La recogida de la muestra de fluido también se puede realizar antes, durante o después de que el sujeto se haya sometido a una o más rondas de terapia contra el cáncer, tal como el tratamiento de radiación y/o quimioterapia.

A continuación se puede evaluar la muestra de fluido para determinar la presencia o la cantidad de HA utilizando un ensayo de unión en fase sólida. Los ensayos de unión en fase sólida pueden detectar un sustrato (p. ej., HA) en una muestra de fluido mediante la unión del sustrato a un agente de unión que se fija o se inmoviliza a una superficie sólida. Un anticuerpo o una proteína de unión específicos del sustrato (p. ej., una HABP proporcionada en la presente memoria), acoplados a una marca detectable (p. ej., una enzima), se aplican y se deja que se unan al sustrato. La presencia del anticuerpo o la proteína unida se detecta y cuantifica. Los métodos de detección y cuantificación incluyen, pero no se limitan a, métodos colorimétricos, fluorescentes, luminiscentes o radiactivos. La elección del método de detección depende de la marca detectable utilizada. En algunos ejemplos, una reacción colorimétrica emplea la enzima acoplada al anticuerpo. Por ejemplo, las enzimas comúnmente empleadas en este método incluyen la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina. La cantidad de sustrato presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producida. Generalmente se emplea un patrón de sustrato para mejorar la precisión cuantitativa. La concentración de HA en una muestra se puede calcular interpolando los datos en una curva patrón. La cantidad de HA se puede expresar como una concentración de muestra de fluido.

Los métodos conocidos para la detección de la expresión de hialuronano en el cáncer incluyen ensayos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a, el ensayo de tipo ELISA descrito por Lokeshwar et al., (1997) Cancer Res. 57:773-777 (véanse también, Veisoh et al., (2014) Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 29:111(17):E1731-9, que describe un ensayo basado en fluorescencia que utiliza HA marcado fluorescentemente; y la Solicitud Internacional Publicada PCT Núm. WO2009/128917) para medir los niveles de HA en orina o extractos de tejido de vejiga de sujetos con cáncer de vejiga. Para el ensayo, la orina o los extractos se recubren en placas de micropocillos (el HA de cordón umbilical utilizado como patrón también se recubre), seguido de incubación (p. ej., 16 horas, temperatura ambiente) con una proteína de unión a HA marcada (p. ej., biotinilada), tal como las descritas en la presente memoria, se lavan y la proteína de unión a HA unida a los pocillos se cuantifica utilizando un sustrato de agente de detección de avidina-biotina. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, la orina de un sujeto con un cáncer de vejiga asociado a HA contenía niveles de HA que aumentaron de 2 a 9 veces en comparación con la orina/extractos de pacientes normales (sujetos sanos o sujetos con otras enfermedades o afecciones gastrourinarias); por lo tanto, el marcador se detectaría si los niveles de HA en la orina fueran elevados en comparación con los sujetos normales, p. ej., elevado entre 2 o aproximadamente 2 veces y 9 o aproximadamente 9

veces, p. ej., una elevación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 veces en comparación con el sujeto normal.

iv. Ensayos de obtención de imágenes *in vivo*

En algunos ejemplos de la presente memoria, la cantidad de HA se detecta utilizando métodos de obtención de imágenes *in vivo*. En tales métodos, una HAP, tal como TSG-6 o una variante del mismo, tal como un multímero del mismo, o un anticuerpo anti-HA se conjugan con un radical detectable o un radical que es susceptible de detección por un método de formación de imágenes. Los métodos de obtención de imágenes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, obtención de imágenes por fluorescencia, rayos X, métodos de resonancia magnética, tales como obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) y espectroscopia de resonancia magnética (MRS), y métodos tomográficos, incluyendo tomografía computada (CT), tomografía axial computarizada (CAT), tomografía computarizada por haz de electrones (EBCT), tomografía computarizada de alta resolución (HRCT), tomografía hipocicloidial, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), tomografía computarizada en espiral y tomografía por ultrasonidos. Por ejemplo, para la obtención de imágenes por fluorescencia, las señales fluorescentes se pueden analizar utilizando un microscopio de fluorescencia o un estereomicroscopio de fluorescencia. Además, también se puede utilizar una cámara de imágenes con poca luz.

En particular, la HAP o anticuerpo están marcados o conjugados con un radical que proporciona una señal o induce una señal que es detectable *in vivo*, cuando se toman imágenes, tales como, pero no limitadas a, imágenes de resonancia magnética (MRI), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), tomografía por emisión de positrones (PET), escintigrafía, cámara gamma, un detector β^+ , un detector γ , obtención de imágenes por fluorescencia y obtención de imágenes por bioluminiscencia. Los métodos de obtención de imágenes/seguimiento ilustrativos incluyen cualquiera de una variedad de métodos de resonancia magnética, tales como la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) y la espectroscopia de resonancia magnética (MRS), y también incluyen cualquiera de una variedad de métodos tomográficos que incluyen tomografía computarizada (CT), tomografía axial computarizada (CAT), tomografía computarizada por haz de electrones (EBCT), tomografía computarizada de alta resolución (TCAR), tomografía hipocicloidial, tomografía por emisión de positrones (PET), rayos gamma (después de la aniquilación de un positrón y un electrón en la exploración por PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), tomografía computarizada en espiral y tomografía ultrasónica. Otros métodos de obtención de imágenes ilustrativos incluyen obtención de imágenes con poca luz, rayos X, señal de ultrasonido, absorción de fluorescencia y bioluminiscencia. Además, las proteínas se pueden marcar con compuestos emisores de luz u otros compuestos electromagnéticos, tales como los compuestos o las moléculas fluorescentes. La detección se puede efectuar detectando la luz emitida u otra radiación electromagnética emitida.

Las etiquetas detectables incluyen reactivos con elementos directamente detectables (p. ej., radiomarcas) y reactivos con elementos detectables indirectamente (p. ej., un producto de reacción). Los ejemplos de marcadores detectables incluyen radioisótopos, compuestos bioluminiscentes, compuestos quimioluminiscentes, compuestos fluorescentes, quelatos metálicos y enzimas. Se puede incorporar una marca detectable a una HAP por métodos químicos o recombinantes.

Las marcas apropiadas para la obtención de imágenes de rayos X son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, Bismuto (III), Oro (III), Lantano (III) o Plomo (II); un ion radioactivo, tal como ^{67}Co , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{113}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{197}Hg , ^{203}Hg , ^{116}In , ^{188}Re , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{99}Tc o ^{90}Y ; un isótopo de resonancia magnética nuclear de espín, tal como Cobalto (II), Cobre (II), Cromo (III), Disprosio (III), Erblio (III), Gadolinio (III), Holmio (III), Hierro (II), Hierro (III), Manganeseo (II), Neodimio (III), Níquel (II), Samario (III), Terbio (III), Vanadio (II) o Iterbio (III); o rodamina o fluoresceína.

Los agentes de contraste se utilizan para la obtención de imágenes por resonancia magnética. Los agentes de contraste ilustrativos incluyen hierro, oro, gadolinio y galio. Las marcas apropiadas para la obtención de imágenes de resonancia magnética son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, flúor, quelatos de gadolinio, metales y óxidos metálicos, tales como, por ejemplo, hierro, galio, oro, gadolinio, magnesio, compuestos marcados con ^1H , ^{19}F , ^{13}C , y ^{15}N . El uso de quelatos en agentes de contraste es conocido en la técnica. Las marcas apropiadas para los métodos de obtención de imágenes tomográficas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, emisores β tales como ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O o ^{64}Cu o (b) emisores γ tales como 1231. Otros radionúclidos ilustrativos que se pueden utilizar, por ejemplo, como marcadores para PET incluyen ^{55}Co , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{60}Cu (II), ^{67}Cu (II), ^{99}Tc , ^{57}Ni , ^{52}Fe y ^{18}F . El anticuerpo o HAP se pueden conjugar con una marca adecuada y/o la proteína puede incluir una radiomarca en sus moléculas constituyentes.

Una lista ilustrativa de núclidos útiles para los métodos de obtención de imágenes proporcionados en la presente memoria incluye, por ejemplo, ^{11}C , ^{13}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{19}F , ^{24}Na , ^{32}P , ^{42}K , ^{51}Cr , ^{55}Fe , ^{59}Fe , ^{57}Co , ^{60}Co , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{67}Ga , ^{75}Se , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{197}Hg , ^{203}Hg , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{213}Po , ^{213}Fr , ^{213}At , ^{213}Ac , ^{213}Th , ^{213}Pa , ^{213}U , ^{213}Np , ^{213}Pu , ^{213}Am , ^{213}Cm , ^{213}Bk , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{213}Mo , ^{213}Tc , ^{213}Ru , ^{213}Rh , ^{213}Pd , ^{213}Ag , ^{213}Cd , ^{213}In , ^{213}Sn , ^{213}Sb , ^{213}Te , ^{213}I , ^{213}Xe , ^{213}Ba , ^{213}La , ^{213}Ce , ^{213}Pr , ^{213}Nd , ^{213}Pm , ^{213}Sm , ^{213}Eu , ^{213}Gd , ^{213}Tb , ^{213}Dy , ^{213}Ho , ^{213}Er , ^{213}Y , ^{213}Zr , ^{213}Nb , ^{21}

⁸¹Kriptón, ⁸²Rubidio, ⁸⁹Estroncio, ⁹²Estroncio, ⁹⁰Itrio, ⁹⁹Tecnecio, ¹⁰³Paladio, ¹⁰⁶Rutenio, ¹¹¹Indio, ¹¹⁷Lutecio, ¹²³Yodo, ¹²⁵Yodo, ¹³¹Yodo, ¹³³Xenón, ¹³⁷Cesio, ¹⁵³Samario, ¹⁵³Gadolinio, ¹⁶⁵Disproso, ¹⁶⁶Holmio, ¹⁶⁹Iterbio, ¹⁷⁷Leutium, ¹⁹⁶Renio, ¹⁸⁸Renio, ¹⁹²Iridio, ¹⁹⁸Oro, ²⁰¹Talio, ²¹¹Astato, ²¹²Bismuto y ²¹³Bismuto. Un experto en la técnica puede alterar los parámetros utilizados en diferentes métodos de obtención de imágenes (MRI, por ejemplo) para visualizar diferentes núclidos/metales.

También se pueden utilizar marcas fluorescentes. Estas incluyen proteínas fluorescentes, sondas fluorescentes o sustratos fluorescentes. Por ejemplo, las proteínas fluorescentes pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas fluorescentes, tales como la proteína verde fluorescente (GFP) o sus homólogos o RFP; colorantes fluorescentes (p. ej., fluoresceína y derivados tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) y Oregon Green®, rodamina y derivados (p. ej., rojo Texas e isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC)), biotina, ficoeritrina, AMCA, Alexa Fluor®, Li-COR®, CyDyes® o DyLight® Fluors); tdTomato, mCherry, mPlum, Neptune, TagRFP, mKate2, TurboRFP y TurboFP635 (Katushka). El reactivo fluorescente se puede elegir en función de los espectros de excitación y emisión deseados por el usuario. También se pueden utilizar sustratos fluorescentes que dan como resultado productos de escisión fluorescentes.

Los métodos de obtención de imágenes *in vivo* se pueden utilizar en el diagnóstico de tumores o cánceres asociados con HA. Tal técnica permite el diagnóstico sin el uso de biopsia. Los métodos de obtención de imágenes *in vivo* basados en el grado o el nivel de unión de una HABP a un tumor también se pueden utilizar para los pronósticos de pacientes con cáncer. Los métodos de obtención de imágenes *in vivo* también se pueden utilizar para detectar cánceres metastásicos en otras partes del cuerpo o células tumorales circulantes (CTC). Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar los niveles de fondo de hialuronano en tejidos distintos de los tumores. Los tumores que expresan hialuronano tendrán niveles más altos de señal que los tejidos de fondo. En algunos ejemplos, los criterios umbral se pueden determinar mediante comparaciones con la señal detectada en sujetos normales o sanos.

b. Recuento de linfocitos pre-tratamiento

La terapia combinada proporcionada en la presente memoria inicia una respuesta inmunitaria, al menos en parte, mediante el bloqueo de las proteínas de puntos de control inmunitario para tratar los cánceres, en particular, los cánceres caracterizados por tener un contenido de HA de moderado a alto. Debido a que la activación de la respuesta inmunitaria se basa en los linfocitos, se puede utilizar el recuento absoluto de linfocitos (ALC) entre los criterios de selección para que los sujetos reciban la terapia combinada que se proporciona en la presente memoria. El ALC y los métodos para determinar el ALC se describen en otra parte en la presente memoria (para el seguimiento de la respuesta a las terapias combinadas que se proporcionan en la presente memoria). Un ALC normal, en un individuo no enfermo, varía de 800/mL a 3.500/mL. Los sujetos seleccionados para el tratamiento utilizando la terapia combinada proporcionada normalmente muestran un ALC dentro o aproximadamente dentro del intervalo normal antes de la selección. Por ejemplo, un sujeto seleccionado para la terapia combinada proporcionada en la presente memoria típicamente tiene un ALC de al menos 800/mL, tal como 800/mL, 900/mL, 1.000/mL, 1.250/mL, 1.500/mL, 2.000/mL, 2.500/mL, 3.000/mL o 3.500/mL. En ejemplos particulares, los sujetos seleccionados para la terapia combinada proporcionada en la presente memoria tienen un ALC de al menos 1.000/mL.

2. Dosificación y administración

La terapia combinada proporcionada en la presente memoria, que contiene un agente anti-hialuronano conjugado con polímero, tal como una enzima de degradación de hialuronano, y un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1), se administra en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil. Típicamente, los agentes activos se administran en una cantidad que no da lugar a efectos secundarios indeseables del paciente que se está tratando, o que minimiza o reduce los efectos secundarios observados en comparación con las dosificaciones y las cantidades requeridas para el tratamiento único con uno de los agentes anteriores. Por ejemplo, como se describe en otra parte en la presente memoria, se encuentra en la presente memoria que la terapia combinada con un enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario produce como resultado una disminución de la progresión tumoral en comparación con la administración de vehículo o cualquiera de los agentes solo. Por lo tanto, es posible, reducir la cantidad de un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, que se puede administrar en la terapia combinada que se proporciona en la presente memoria, en comparación con las cantidades del inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., el anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario) administradas utilizando métodos de la técnica anterior, mientras que logra sustancialmente la misma o mejor eficacia terapéutica. En virtud de la disminución de la dosificación que se puede administrar, los efectos secundarios asociados con la administración de anticuerpos anti-proteína de puntos de control inmunitario, tales como los eventos adversos relacionados con el sistema inmunológico, descritos en otra parte en la presente memoria, se reducen, minimizan o evitan.

Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar las cantidades precisas de agentes activos, incluyendo el agente anti-hialuronano, p. ej., la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y el inhibidor de puntos de control inmunitario que se van a administrar a un sujeto. Por ejemplo, tales agentes y usos para el tratamiento de cánceres y tumores sólidos, son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, las dosificaciones de tales agentes en una composición o terapia combinada se pueden elegir en función de los regímenes de dosificación convencionales para ese agente en una vía de administración determinada.

Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento son una función del tejido o tumor que se está tratando y se pueden determinar empíricamente utilizando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación a partir de datos de prueba *in vivo* o *in vitro* y/o se pueden determinar a partir de regímenes de dosificación conocidos del agente en particular. Cabe señalar que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado, el peso del individuo, la vía de administración y/o el grado o gravedad de la enfermedad y otros factores que están dentro del nivel de consideración de un facultativo médico. En general, los regímenes de dosificación se eligen para limitar la toxicidad. Se debe tener en cuenta que el médico a cargo sabrá cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la terapia a una dosificación más baja debido a toxicidad, disfunción de la médula ósea, hígado o riñón u otro tejido. Por el contrario, el médico a cargo también sabrá cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo los efectos secundarios tóxicos). Se debe entender además que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración expuestas en la presente memoria son solamente ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de los mismos.

Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (p. ej., PEGPH20), se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para degradar o escindir el hialuronano asociado a tumores. La cantidad de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, que se administrará para el tratamiento de una enfermedad o afección, por ejemplo un cáncer o un tumor sólido tal como un tumor rico en HA, se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Adicionalmente, se pueden emplear ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa, que se puede determinar empíricamente, puede depender de la enzima particular, la vía de administración, el tipo de enfermedad a tratar y la gravedad de la enfermedad. El intervalo de dosificación ilustrativo es de aproximadamente 50 Unidades a 50.000.000 Unidades de una enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero, o una cantidad funcionalmente equivalente de otra enzima de degradación del hialuronano conjugada con un polímero. Se entiende en la presente memoria que una unidad de actividad se normaliza a una actividad convencional, por ejemplo, una actividad medida en un ensayo de microturbidez que analiza la actividad de la hialuronidasa.

Así, por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20, conjugada con un polímero, por ejemplo, un PEG, se puede administrar a o aproximadamente a 10 a 50.000.000 unidades, de 10 a 40.000.000 unidades, de 10 a 36.000.000 unidades, de 10 a 12.000.000 unidades, de 10 a 1.200.000 unidades, de 10 a 1.000.000 unidades, de 10 a 500.000 unidades, de 100 a 100.000 unidades, de 500 a 50.000 unidades, de 1.000 a 10.000 unidades, de 5.00 a 7.500 unidades, de 5.000 unidades a 50.000 unidades, o de 1.000 a 10.000 Unidades. En general, se administra una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero a un sujeto en una cantidad que está entre o aproximadamente entre 0,01 µg/kg y 25 mg/kg, tal como de 0,0005 mg/kg (0,5 µg/kg) a 25 mg/kg, de 0,5 µg/kg a 10 mg/kg, de 0,02 mg/kg a 1,5 mg/kg, de 0,01 µg/kg a 15 µg/kg, de 0,05 µg/kg a 10 µg/kg, de 0,75 µg/kg a 7,5 µg/kg o de 1,0 µg/kg a 3,0 µg/kg. Por ejemplo, la cantidad del intervalo de dosificación puede estar entre o aproximadamente entre 0,01 µg/kg y 100 µg/kg (del sujeto), de 0,01 µg/kg a 50 µg/kg, de 0,01 µg/kg a 15 µg/kg, de 0,05 µg/kg a 10 µg/kg, de 0,75 µg/kg a 7,5 µg/kg, de 1,0 µg/kg a 5,0 o de 1,0 µg/kg a 3,0 µg/kg del sujeto. La enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se puede administrar, por ejemplo, a una dosis de al menos o aproximadamente al menos 0,00001 mg/kg (0,01 µg/kg) del sujeto, tal como 0,0005 mg/kg, 0,0006 mg/kg, 0,0007 mg/kg, 0,0008 mg/kg, 0,0009 mg/kg, 0,001 mg/kg, 0,0016 mg/kg, 0,002 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,004 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,006 mg/kg, 0,007 mg/kg, 0,008 mg/kg, 0,009 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,016 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23 mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg o más, para un sujeto humano adulto promedio, que típicamente pesa aproximadamente de 70 kg a 75 kg.

Una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como una hialuronidasa PEGilada (p. ej., PEGPH20), proporcionada en la presente memoria se administra a más de 0,5 Unidades/kg, tal como entre o aproximadamente entre 1 Unidad/kg y 800.000 Unidades/kg, tal como de 10 a 800.000 Unidades/kg, de 10 a

750.000 Unidades/kg, de 10 a 700.000 unidades/kg, de 10 a 650.000 unidades/kg, de 10 a 600.000 unidades/kg, de 10 a 550.000 unidades/kg, de 10 a 500.000 unidades/kg, de 10 a 450.000 unidades/kg, de 10 a 400.000 unidades/kg, de 10 a 350.000 unidades/kg, de 10 a 320.000 unidades/kg, de 10 a 300.000 unidades/kg, de 10 a 280.000 unidades/kg, de 10 a 260.000 unidades/kg, de 10 a 240.000 unidades/kg, de 10 a 220.000 unidades/kg, de 10 a 200.000 Unidades/kg, de 10 a 180.000 Unidades/kg, de 10 a 160.000 Unidades/kg, de 10 a 140.000 Unidades/kg, de 10 a 120.000 Unidades/kg, de 10 a 100.000 Unidades/kg, de 10 a 80.000 Unidades/kg, de 10 a 70.000 Unidades/kg, de 10 a 60.000 unidades/kg, de 10 a 50.000 unidades/kg, de 10 a 40.000 unidades/kg, de 10 a 30.000 unidades/kg, de 10 a 20.000 unidades/kg, de 10 a 15.000 unidades/kg, de 10 a 12.800 unidades/kg, de 10 a 10.000 unidades/kg, de 10 a 9.000 unidades/kg, de 10 a 8.000 unidades/kg, de 10 a 7.000 unidades/kg, de 10 a 6.000 unidades/kg, de 10 a 5.000 unidades/kg, de 10 a 4.000 unidades/kg, de 10 a 3.000 unidades/kg, de 10 a 2.000 unidades/kg, de 10 a 1.000 unidades/kg, de 10 a 900 unidades/kg, de 10 a 800 unidades/kg, de 10 a 700 Unidades/kg, de 10 a 500 Unidades/kg, de 10 a 400 Unidades/kg, de 10 a 300 Unidades/kg, de 10 a 200 Unidades/kg, de 10 a 100 Unidades/kg, de 16 a 600.000 Unidades/kg, de 16 a 500.000 Unidades/kg, de 16 a 400.000 Unidades/kg, de 16 a 350.000 Unidades/kg, de 16 a 320.000 Unidades/kg, de 16 a 160.000 Unidades/kg, de 16 a 80.000 Unidades/kg, de 16 a 40.000 Unidades/kg, de 16 a 20.000 Unidades/kg, de 16 a 16.000 Unidades/kg, de 16 a 12.800 Unidades/kg, de 16 a 10.000 Unidades/kg, de 16 a 5.000 Unidades/kg, de 16 a 4.000 Unidades/kg, de 16 a 3.000 Unidades/kg, de 16 a 2.000 Unidades/kg, de 16 a 1.000 unidades/kg, de 16 a 900 unidades/kg, de 16 a 800 unidades/kg, de 16 a 700 unidades/kg, de 16 a 500 unidades/kg, de 16 a 400 unidades/kg, de 16 a 300 unidades/kg, de 16 a 200 Unidades/kg, de 16 a 100 Unidades/kg, de 160 a 12.800 Unidades/kg, de 160 a 8.000 Unidades/kg, de 160 a 6.000 Unidades/kg, de 160 a 4.000 Unidades/kg, de 160 a 2.000 Unidades/kg, de 160 a 1.000 unidades/kg, de 160 a 500 unidades/kg, de 500 a 5.000 unidades/kg, de 100 0 a 100.000 Unidades/kg o de 1.000 a 10.000 Unidades/kg, de la masa del sujeto al que se administra. En algunos ejemplos, una enzima de degradación de hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como una hialuronidasa PEGilada (p. ej., PEGPH20) se puede administrar a, o aproximadamente entre 0,5 Unidades/kg y 4.000 Unidades/kg, de 1 Unidad/kg a 1.000 Unidades/kg, de 1 Unidad/kg a 500 Unidades/kg, de 5 unidades/kg a 500 unidades/kg, de 10 unidades/kg a 500 unidades/kg, de 20 unidades/kg a 400 unidades/kg o de 10 unidades/kg a 50 unidades/kg.

Generalmente, cuando la actividad específica de la hialuronidasa PEGilada es o es de aproximadamente 10.000 U/mg a 80.000 U/mg, tal como de 20.000 U/mg a 60.000 U/mg o de 18.000 U/mg a 45.000 U/mg, generalmente se administran al menos o al menos aproximadamente 1 Unidades/kg (U/kg), 2 U/kg, 3 U/kg, 4 U/kg, 5 U/kg, 6 U/kg, 7 U/kg, 8 U/kg, 8 U/kg 10 U/kg, 16 U/kg, 32 U/kg, 64 U/kg, 100 U/kg, 200 U/kg, 300 U/kg, 400 U/kg, 500 U/kg, 600 U/kg, 700 U/kg, 800 U/kg, 900 U/kg, 1.000 U/kg, 2.000 U/kg, 3.000 U/kg, 4.000 U/kg, 5.000 U/kg, 6.000 U/kg, 7.000 U/kg, 8.000 U/kg, 9.000 U/kg, 10.000 U/kg, 12.800 U/kg, 20.000 U/kg, 32.000 U/kg, 40.000 U/kg, 50.000 U/kg, 60.000 U/kg, 70.000 U/kg, 80.000 U/kg, 90.000 U/kg, 100.000 U/kg, 120.000 U/kg, 140.000 U/kg, 160.000 U/kg, 180.000 U/kg, 200.000 U/kg, 220.000 U/kg, 240.000 U/kg, 260.000 U/kg, 280.000 U/kg, 300.000 U/kg, 320.000 U/kg, 350.000 U/kg, 400.000 U/kg, 450.000 U/kg, 500.000 U/kg, 550.000 U/kg, 600.000 U/kg, 650.000 U/kg, 700.000 U/kg, 750.000 U/kg, 800.000 U/kg o más, por masa del sujeto. Por ejemplo, se administran al menos 1.000 Unidades (U); 2.000 U; 3.000 U; 4.000 U; 5.000 U; 6.000 U; 7.000 U; 8.000 U; 9.000 U; 10.000 U; 20.000 U; 30.000 U; 40.000 U; 50.000 U; 60.000 U; 70.000 U; 80.000 U; 90.000 U; 100.000 U; 200.000 U; 300.000 U; 400.000 U; 500.000 U; 600.000 U; 700.000 U; 800.000 U; 900.000 U; 1.000.000 U; 1.500.000 U; 2.000.000 U; 2.500.000 U; 3.000.000 U; 3.500.000 U; 4.000.000 U o más.

En los ejemplos de la presente memoria, el inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, se proporciona en una cantidad terapéuticamente eficaz para el régimen de dosificación particular. Las concentraciones terapéuticamente eficaces se pueden determinar empíricamente sometiendo a prueba los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos, tales como los ensayos proporcionados en la presente memoria. La concentración de un inhibidor de puntos de control inmunitario seleccionado en la composición depende de las tasas de absorción, inactivación y excreción del complejo, de las características fisicoquímicas del complejo, del programa de dosificación y de la cantidad administrada, así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento son una función del tipo de cáncer que se está tratando y se puede determinar empíricamente utilizando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación de datos de pruebas *in vivo* o *in vitro*. Cabe señalar que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado. Se debe entender además que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración expuestos en la presente memoria son solamente ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de los mismos.

La cantidad de un inhibidor de puntos de control inmunitario seleccionado que se administrará para el tratamiento de los cánceres se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales u otros métodos como se describe en la presente memoria. Adicionalmente, se pueden emplear ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a

identificar los intervalos de dosificación óptimos. Por lo tanto, la dosificación precisa, que se puede determinar empíricamente, puede depender de la preparación de inmunoglobulina particular, del régimen y el programa de dosificación con la hialuronidasa soluble, la vía de administración, el tipo de cáncer que se vaya a tratar y la progresión de la enfermedad. Los regímenes de dosificación ilustrativos (dosis y frecuencias) de las formulaciones de inhibidores de puntos de control inmunitario para el tratamiento de cánceres se proporcionan a continuación. Otros regímenes de dosificación son bien conocidos por los expertos en la técnica. Si es necesario, la dosificación particular, la duración y el protocolo de tratamiento se pueden determinar empíricamente o se pueden extrapolar.

En algunos ejemplos, la dosis de un inhibidor de puntos de control inmunitario es una función de las poblaciones de células inmunitarias. Por ejemplo, la dosis del inhibidor de puntos de control inmunitario se puede modular para minimizar el aumento en el número de células T_{reg} en respuesta al agente administrado. Por ejemplo, se puede determinar que la dosis máxima es la dosis máxima que no produce un aumento en el número de células T_{reg} . En otro ejemplo, la dosis de un inhibidor de puntos de control inmunitario se puede modular para maximizar el aumento en el número de células efectoras en el sujeto que porta un tumor. En un ejemplo adicional, se selecciona la dosis de un inhibidor de puntos de control inmunitario que minimice o prevenga y aumente el número de células T_{reg} , pero maximice el aumento en el número de células efectoras. Los métodos para determinar tales dosis son conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria. Por ejemplo, el número de células T_{reg} y/o las células efectoras se puede medir mediante citometría de flujo (descrita en la presente memoria anteriormente) en uno o más puntos temporales diferentes después de la administración del inhibidor de puntos de control inmunitario. Por ejemplo el número de células T_{reg} y/o células efectoras se puede determinar el mismo día de la administración y/o 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas o más después de la administración del inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o 1 semana después de la administración del inhibidor de puntos de control inmunitario. La siguiente dosis se puede modular para lograr los efectos deseados con respecto a los niveles de células T_{reg} y/o células efectoras detectados.

En algunos ejemplos, se pueden utilizar dosis ilustrativas de un inhibidor de puntos de control inmunitario administrado por vía intravenosa, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario, como punto de partida para determinar las dosificaciones apropiadas. Los niveles de dosificación se pueden determinar en función de una variedad de factores, tales como el peso corporal del individuo, la salud general, la edad, la actividad del compuesto específico empleado, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y el curso de la enfermedad, y la posición del paciente con respecto a la enfermedad y el juicio del médico a cargo. Las dosificaciones ilustrativas no limitantes de los inhibidores de puntos de control inmunitario proporcionados son de aproximadamente 0,1 mg por kg de peso corporal (mg/kg de PC) a aproximadamente 50 mg/kg de PC, tal como de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de PC, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de PC, de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 10 mg/kg de PC, de aproximadamente 0,5 mg/kg a 5 mg/kg o de 0,5 mg/kg a 1 mg/kg. Por ejemplo, el inhibidor de puntos de control inmunitario se puede administrar a animales portadores de tumores en dosis de, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23 mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg o más. En particular, el inhibidor de puntos de control inmunitario se administra a una dosis de al menos 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, o 15 mg/kg. En algunos ejemplos, las dosificaciones ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente o de 0,01 mg/m² a aproximadamente 500 mg/m², tal como por ejemplo, aproximadamente o 0,01 mg/m², aproximadamente o 0,1 mg/m², aproximadamente o 0,5 mg/m², aproximadamente o 1 mg/m², aproximadamente o 5 mg/m², aproximadamente o 10 mg/m², aproximadamente o 15 mg/m², aproximadamente o 20 mg/m², aproximadamente o 25 mg/m², aproximadamente o 30 mg/m², aproximadamente o 35 mg/m², aproximadamente o 40 mg/m², aproximadamente o 45 mg/m², aproximadamente o 50 mg/m², aproximadamente o 100 mg/m², aproximadamente o 150 mg/m², aproximadamente o 200 mg/m², aproximadamente o 250 mg/m², aproximadamente o 300 mg/m², aproximadamente o 400 mg/m², aproximadamente o 500 mg/m². Se entiende que un experto en la técnica puede reconocer y convertir las dosificaciones entre unidades de mg/kg y mg/m² (véase, p. ej., Michael J. Derelanko, TOXICOLOGIST'S POCKET HANDBOOK, CRC Press, pág.16 (2000)).

Se entiende que la cantidad que se vaya a administrar será una función del tipo de cáncer que se esté tratando, de la vía de administración y de la tolerabilidad de los posibles efectos secundarios. Si es necesario, la dosificación se puede determinar empíricamente. Para lograr tales dosificaciones, los volúmenes de formulaciones que contienen inhibidores de puntos de control inmunitario administrados por vía subcutánea pueden ser de aproximadamente 1 mL a 700 mL, por ejemplo, de 10 mL a 500 mL, tal como de 100 mL a 400 mL. Por ejemplo, los volúmenes de formulaciones que contienen inhibidores de puntos de control inmunitario administradas por vía subcutánea pueden ser al menos o aproximadamente al menos 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL o más para la administración de una sola dosificación.

En otros ejemplos, la dosis del inhibidor de puntos de control inmunitario es una dosis baja, tal como menor o igual a 1 mg por administración, por ejemplo, menor o igual a 500 µg, 400 µg, 300 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg, 30 µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg o 1 µg por administración. Se apreciará que tales dosis bajas se pueden administrar en un volumen adecuado repetidamente al paciente a lo largo del tiempo, por ejemplo, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, mensualmente, etc.

La enzima de degradación de hialuronano y las formulaciones de inhibidores de puntos de control inmunitario proporcionadas en la presente memoria se pueden administrar por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral, intradérmica, oral o por otras vías de administración. La ruta particular puede diferir entre los agentes administrados o puede ser la misma. Por ejemplo, uno o más, o todos los agentes, se pueden administrar por vía intravenosa. En algunos ejemplos, se contempla en la presente memoria que una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se administre por vía intravenosa y el inhibidor de puntos de control inmunitario se administre por vía intravenosa.

Para la administración intravenosa, uno o más, o todos, los agentes se pueden administrar por inyección intravenosa lenta o en embolada, por infusión, o por una combinación de los mismos. El tiempo de infusión puede ser de aproximadamente 1 minuto a tres horas, tal como de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente dos horas o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, y generalmente al menos 10 minutos, 40 minutos o 60 minutos. Los agentes se pueden administrar por infusión concurrente o por infusión subsiguiente. Por ejemplo, los agentes administrados se administran por separado y se proporcionan en bolsas separadas para infusiones separadas. En ejemplos particulares, la composición de enzima de degradación de hialuronano y la composición inhibidora de puntos de control inmunitario se formulan y administran por separado.

3. Régimen de dosificación: frecuencia y ciclo de administración

El agente anti-hialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, se puede administrar antes, simultáneamente con o casi simultáneamente con, secuencialmente o de manera intermitente con el inhibidor de puntos de control inmunitario. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., PEGPH20, y el inhibidor de puntos de control inmunitario, p. ej., un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario (p. ej., un anticuerpo anti-CTLA4 o anti-PD-1) se pueden administrar conjuntamente o por separado.

En general, el agente anti-hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano, se administra antes del inhibidor de puntos de control inmunitario. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se administra hasta 48 horas antes de administrar el inhibidor de puntos de control inmunitario. Por ejemplo, el agente anti-hialuronano, o enzima de degradación de hialuronano, se administra al menos o al menos aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas, hasta 48 horas antes de la administración del inhibidor de puntos de control inmunitario.

La frecuencia y el momento de la administración, y las cantidades de dosificación, se pueden administrar periódicamente durante un ciclo de administración para mantener un efecto continuo y/o a largo plazo de los agentes activos durante un tiempo deseado y no es necesario que sean iguales para la enzima de degradación de hialuronano y el inhibidor de puntos de control inmunitario. Las combinaciones o composiciones proporcionadas se pueden administrar cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o una vez. La duración del ciclo de administración se puede determinar empíricamente y depende de la enfermedad a tratar, de la gravedad de la enfermedad, del paciente en particular y de otras consideraciones dentro del nivel de conocimiento práctico del médico a cargo. La duración del tratamiento con una terapia combinada en la presente memoria proporcionada puede ser una semana, dos semanas, un mes, varios meses, un año, varios años o más.

Por ejemplo, la frecuencia de administración de la enzima de degradación de hialuronano es una vez al día, una vez cada dos días, dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas o una vez cada 4 semanas. Las dosificaciones se pueden dividir en una pluralidad de ciclos de administración durante el curso del tratamiento. Por ejemplo, una enzima hialuronidasa se puede administrar con una frecuencia de aproximadamente un mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, un año o más. La frecuencia de administración puede ser la misma durante todo el período del ciclo o puede diferir. Por ejemplo, una frecuencia de dosificación ilustrativa es dos veces por semana al menos durante una primera semana de un ciclo de administración. Después de la primera semana, la frecuencia puede continuar dos veces por semana, puede aumentar a más de dos veces por semana o se puede reducir a no más de una vez por semana. Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar la frecuencia de dosificación particular y el ciclo de administración en función de la dosificación particular que se vaya a administrar, la enfermedad o afección que se esté tratando, la gravedad de la enfermedad o afección, la edad del sujeto y otros factores similares.

El inhibidor de puntos de control inmunitario se puede administrar a la misma frecuencia o a una frecuencia diferente, pero cada administración del inhibidor de puntos de control inmunitario está precedida por una

administración de enzima de degradación de hialuronano en no más de 48 horas. Por ejemplo, en algunos ejemplos, cada dosis de enzima de degradación de hialuronano está seguida de 24 a 48 h más tarde por una dosis de inhibidor de puntos de control inmunitario. En ejemplos particulares, el inhibidor de puntos de control inmunitario se administra con menos frecuencia que la enzima de degradación de hialuronano, pero cada dosis del inhibidor de puntos de control inmunitario está precedida por una dosis de la enzima de degradación del hialuronano. Por ejemplo, el inhibidor de puntos de control inmunitario se administra dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 2 meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, o una vez cada 6 meses, y de una manera que está precedida por la administración de una enzima de degradación de hialuronano. En tales ejemplos, la dosis de la enzima de degradación de hialuronano que precede al inhibidor de puntos de control inmunitario está sincronizada con el programa de dosificación de la enzima de degradación de hialuronano. En general, el inhibidor de puntos de control inmunitario se administra no más de una vez al mes, tal como una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

Si los síntomas de la enfermedad persisten en ausencia de un tratamiento interrumpido, el tratamiento se puede continuar durante un período de tiempo adicional. A lo largo del tratamiento, se puede realizar un seguimiento de la evidencia de enfermedad y/o la toxicidad o los efectos secundarios relacionados con el tratamiento.

El ciclo de administración, de la enzima de degradación del hialuronano y/o del inhibidor de puntos de control inmunitario, se puede adaptar para añadir períodos de tratamiento interrumpido con el fin de proporcionar un período de descanso de la exposición a los agentes. El período de tiempo para la interrupción del tratamiento puede ser durante un tiempo predeterminado o se puede determinar empíricamente según la respuesta del paciente o según los efectos secundarios observados. Por ejemplo, el tratamiento se puede suspender durante una semana, dos semanas, un mes o varios meses. En general, el período interrupción del tratamiento se basa en un ciclo de régimen de dosificación para un paciente.

Por ejemplo, un régimen de dosificación ilustrativo es un ciclo de tratamiento o ciclo de administración de 28 días. El agente, como el agente anti-hialuronano, p. ej., una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, se puede administrar el día 1, seguido de la administración del inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario el día 2, seguido de 26 días sin dosificación. En otro ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano se puede administrar dos veces por semana, los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25, y el inhibidor de puntos de control inmunitario se administra una vez el día 2. En otro ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano se administra dos veces por semana, los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25, y el inhibidor de puntos de control inmunitario también se administra dos veces por semana los días 2, 5, 9, 12, 16, 19, 23, y 26. Se entiende que la descripción anterior es solo para fines ilustrativos y que se pueden emplear variaciones de lo anterior. Adicionalmente, se pueden aplicar ciclos de administración similares a todos los agentes administrados, o se puede emplear cada agente administrado en su propio régimen de dosificación en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria.

Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar el ciclo preciso de administración y el programa de dosificación. Como se indicó anteriormente, el ciclo de administración puede ser durante cualquier período de tiempo deseado. Por lo tanto, el ciclo de administración de 28 días se puede repetir durante cualquier período de tiempo. Está dentro del conocimiento práctico de la técnica del médico a cargo adoptar un ciclo de administración y un régimen de dosificación que satisfagan las necesidades del paciente según las consideraciones personales específicas del paciente y de la enfermedad a tratar.

Los métodos proporcionados también pueden incluir la administración de un corticosteroide antes, concurrentemente, intermitentemente o después de la administración del agente anti-hialuronano. El ciclo de administración puede ser durante cualquier período de tiempo, y está dentro del nivel del médico o clínico a cargo. Normalmente, el número predeterminado de semanas es de 3 semanas o 4 semanas, pero puede ser más largo. El ciclo de administración se puede repetir varias veces según el estado de la enfermedad y la respuesta del sujeto.

4. Tratamientos Combinados Adicionales

La terapia combinada proporcionada en la presente memoria se puede utilizar sola y combinada adicionalmente con otras terapias o tratamientos. Las combinaciones o composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden formular o administrar conjuntamente junto con, antes, de forma intermitente o con posterioridad a otros agentes o tratamientos terapéuticos o farmacológicos, tales como procedimientos. Por ejemplo, tales agentes incluyen, pero no se limitan a, otros agentes biológicos, agentes anticancerosos, compuestos de moléculas pequeñas, agentes dispersantes, anestésicos, vasoconstrictores y cirugía, y combinaciones de los mismos. Tales agentes también pueden incluir uno o más agentes para mejorar, reducir o prevenir efectos secundarios. En algunos casos, la terapia combinada se puede utilizar combinada con uno o más tratamientos para el cáncer que extirpan el tumor primario antes del tratamiento. Por ejemplo, se puede utilizar quimioterapia o radioterapia adicionales y sus combinaciones, además de la terapia combinada que se proporciona en la presente memoria. En otros ejemplos, la

extirpación quirúrgica puede no ser necesaria. Otros métodos ilustrativos que se pueden combinar incluyen la administración de un compuesto que disminuye la velocidad de proliferación del tumor o las células neoplásicas sin debilitar el sistema inmunológico (p. ej., administrando compuestos supresores de tumores o administrando compuestos específicos de células tumorales) o administrando un compuesto inhibidor de la angiogénesis. En un ejemplo adicional, se puede administrar una vacuna como parte de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. En algunos ejemplos, la vacuna puede ser una vacuna contra el tumor que expresa citoquinas, tal como una vacuna contra el tumor que expresa GM-CSF (véase p. ej., Jinushi et al., (2007) J Clin Invest 117: 1902-1913), o una vacuna de antígeno tumoral para promover adicionalmente una respuesta inmunitaria antitumoral.

Se puede administrar una preparación de un segundo agente o agentes o tratamiento o tratamientos de una vez, o se puede dividir en numerosas dosis más pequeñas que se van a administrar a intervalos de tiempo. Las preparaciones de agente/tratamiento seleccionadas se pueden administrar en una o más dosis a lo largo del tiempo de tratamiento, por ejemplo, durante varias horas, días, semanas o meses. En algunos casos, la administración continua es útil. Se entiende que la dosificación precisa y el curso de la administración dependen de la indicación y la tolerabilidad del paciente. En general, los regímenes de dosificación para segundos agentes/tratamientos en la presente memoria son conocidos por un experto en la técnica.

a. Corticosteroides

La terapia combinada proporcionada en la presente memoria se puede utilizar sola o combinada adicionalmente con uno o más corticosteroides. Un corticosteroide se administra en una cantidad que es terapéuticamente eficaz para mejorar o reducir uno o más efectos adversos de la administración de un enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero u otro agente, en particular, efectos musculoesqueléticos adversos que pueden ocurrir en la administración sistémica de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, y particularmente una hialuronidasa modificada con polímero, tal como una PEGPH20. Una cantidad terapéuticamente eficaz es la dosificación suficiente para mejorar, prevenir, eliminar o reducir uno o más síntomas o efectos adversos. Los indicadores de mejora o de un tratamiento previo satisfactorio incluyen la determinación de la imposibilidad para manifestar una puntuación relevante en la escala CTCAE o un cambio en la calificación o la gravedad en la escala CTCAE.

Los corticosteroides son una clase de hormonas esteroideas que se producen en la corteza suprarrenal. Los corticosteroides están involucrados en una amplia gama de sistemas fisiológicos, tales como la respuesta al estrés, la respuesta inmunitaria y la regulación de la inflamación, el metabolismo de los carbohidratos, el catabolismo de las proteínas, los niveles de electrolitos en la sangre y el comportamiento. Estos incluyen glucocorticoides, que son agentes antiinflamatorios con una gran cantidad de otras funciones y mineralocorticoides, que controlan el equilibrio salino e hídrico principalmente a través de la acción sobre los riñones.

Los glucocorticoides son una clase de hormonas esteroideas, p. ej., corticosteroides, que se unen al receptor de glucocorticoides. Los glucocorticoides causan sus efectos al unirse al receptor de glucocorticoides. Entre otras actividades, el complejo glucocorticoide activado regula por aumento a su vez la expresión de proteínas antiinflamatorias en el núcleo y reprime la expresión de proteínas proinflamatorias en el citosol al prevenir la translocación de otros factores de transcripción del citosol al núcleo.

En general, se puede utilizar cualquier corticosteroide, p. ej., glucocorticoide, en las combinaciones o combinaciones para su uso que se proporcionan en la presente memoria. Los glucocorticoides incluyen glucocorticoides sintéticos y no sintéticos. Los glucocorticoides ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: alclometasonas, algestonas, beclometasonas (p. ej., beclometasona dipropionato), betametasonas (p. ej., 17-valerato de betametasona, acetato sódico de betametasona, fosfato sódico de betametasona, valerato de betametasona), budesonidas, clobetasoles (p. ej., propionato de clobetasol), clobetasonas, clocortolonas (p. ej., pivalato de clocortolona), clprednol, corticosteronas, cortisonas e hidrocortisonas (p. ej., acetato de hidrocortisona), cortivazoles, deflazacort, desonidas, desoximetasonas, dexametasonas (p. ej., 21-fosfato de dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona), diflorasonas (p. ej., diacetato de diflorasona), diflucortolonas, difluprednatos, enoxolonas, fluazacort, flucoronidas, fludrocortisonas (p. ej., acetato de fludrocortisona), flumetasonas (p. ej., pivalato de flumetasona), flunisolidas, fluocinolonas (p. ej., acetónido de fluocinolona), fluocinonidas, fluocortinas, fluocortolonas, fluorometolonas (p. ej., acetato de fluorometolona), fluperolonas (p. ej., acetato de fluperolona), fluprednidenos, fluprednisolonas, flurandrenolidas, fluticasonas (p. ej., propionato de fluticasona), formocortales, halcinonidas, halobetasoles, halometasonas, halopredonas, hidrocortamatós, hidrocortisonas (p. ej., 21-butilato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, hemisuccinato de hidrocortisona, probutato de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona), etabonato de loteprednol, mazipredonas, medrisonas, meprednisolonas, metilprednisolonas (aceponato de metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, hemisuccinato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona), mometasonas (p. ej., furoato de mometasona), parametasonas (p. ej., acetato de parametasona), prednicarbatos, prednisolonas (p. ej., 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, 21-hemisuccinato de prednisolona, acetato

de prednisolona; farnesilato de prednisolona, hemisuccinato de prednisolona, prednisolona-21 (beta-D-glucuronido), metasulfobenzato de prednisolona, esteagato de prednisolona, tebutato de prednisolona, tetrahidroftalato de prednisolona), prednisonas, prednival, prednilidenos, rimexolonas, tixocortoles, triamcinolonas (p. ej., acetónido de triamcinolona, benetonido de triamcinolona, hexacetónido de triamcinolona, acetónido de triamcinolona 21-palmitato, diacetato de triamcinolona). Estos glucocorticoides y las sales de los mismos se comentan con detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (16ª ed. 1980).

En algunos ejemplos, el glucocorticoide se selecciona entre cortisonas, dexametasonas, hidrocortisonas, metilprednisolonas, prednisolonas y prednisonas. En un ejemplo particular, el glucocorticoide es dexametasona.

El corticosteroide se proporciona a una dosis terapéuticamente eficaz. La concentración terapéuticamente efectiva se puede determinar empíricamente probando en sistemas *in vitro* o *in vivo* (p. ej., modelos animales). Por ejemplo, la cantidad de un corticosteroide seleccionado que se va a administrar para mejorar los efectos adversos se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden emplear modelos animales para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosificación precisa, que se puede determinar empíricamente, puede depender de la preparación terapéutica particular, el régimen y el programa de dosificación, la vía de administración y la gravedad de la enfermedad.

La concentración de un agente terapéutico seleccionado en la composición depende de las tasas de absorción, inactivación y excreción, las características fisicoquímicas, el programa de dosificación y la cantidad administrada, así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento son una función de la enfermedad o afección, el tejido que se está tratando, el paciente o sujeto y el agente anti-hialuronano, incluyendo la cantidad y el régimen de dosificación. La dosis del corticosteroide también puede variar según la edad y la salud del paciente, la dosis de la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p. ej., dosificación de enzima de degradación de hialuronano PEGilada), la potencia del corticosteroide y la vía de administración. Por ejemplo, se debe observar que las concentraciones y los valores de dosificaciones variarán con la dosis terapéutica y el régimen de dosificación de la enzima de degradación de hialuronano. Además, el corticosteroide se puede administrar diariamente, semanalmente, mensualmente o durante períodos más prolongados de tiempo para lograr los resultados deseados. El volumen de dosificación particular puede variar y depende del régimen de dosificación, la frecuencia de administración y la velocidad de administración deseada. Cabe señalar que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado.

La dosificación precisa y la duración del tratamiento se pueden determinar empíricamente utilizando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación de datos de prueba *in vivo* o *in vitro*. Se debe entender además que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración expuestos en la presente memoria son solamente ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la misma. Generalmente, los regímenes de dosificación se eligen para limitar la toxicidad, y en la presente memoria se eligen para mejorar los efectos secundarios adversos. Se debe tener en cuenta que el médico a cargo sabrá cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la terapia a una dosificación más baja debido a la toxicidad, disfunción de la médula ósea, hígado o riñón u otro tejido. Por el contrario, el médico a cargo también sabrá cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo los efectos secundarios tóxicos). La administración de un agente terapéutico no debe exceder los niveles de dosificación máximos expuestos por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos o publicados en Physician's Desk Reference.

En general, la dosis de corticosteroide administrada depende de los corticosteroides específicos, ya que existe una diferencia en la potencia entre los diferentes corticosteroides (véase la Tabla 10 a continuación). El corticosteroide, o glucocorticoide, por ejemplo dexametasona, se puede administrar por vía oral (comprimidos, líquido o producto concentrado líquido), por vía intravenosa (IV) o por vía intramuscular. El corticosteroide se administra típicamente en forma de embolada, pero muchos se administran durante un período de tiempo, siempre que la dosis sea eficaz para mejorar uno o más efectos secundarios asociados con la administración del agente anti-hialuronano, por ejemplo, una hialuronidasa PEGilada.

Tabla 10. Administración de glucocorticoides	
Glucocorticoide (ruta)	Potencia equivalente (mg)
Hidrocortisona (IV o PO)	20
Prednisona	5
Prednisolona (IV o PO)	5

Tabla 10. Administración de glucocorticoides	
Glucocorticoide (ruta)	Potencia equivalente (mg)
Succinato sódico de metilprednisolona (IV)	4
Dexametasona (IV o PO)	0,5-0,75

El corticosteroide se puede administrar en cualquier cantidad que sea eficaz para mejorar uno o más efectos secundarios asociados con la administración de la enzima de degradación de hialuronano. Así, el corticosteroide, p. ej., glucocorticoide, se puede administrar, por ejemplo, en una cantidad entre aproximadamente 0,1 y 100 mg, por dosis, de 0,1 a 80 mg, de 0,1 a 60 mg, de 0,1 a 40 mg, de 0,1 a 30 mg, de 0,1 a 20 mg, de 0,1 a 15 mg, de 0,1 a 10 mg, de 0,1 a 5 mg, de 0,2 a 40 mg, de 0,2 a 30 mg, de 0,2 a 20 mg, de 0,2 a 15 mg, de 0,2 a 10 mg, de 0,2 a 5 mg, de 0,4 a 40 mg, de 0,4 a 30 mg, de 0,4 a 20 mg, de 0,4 a 15 mg, de 0,4 a 10 mg, de 0,4 a 5 mg, de 0,4 a 4 mg, de 1 a 20 mg, de 1 a 15 mg o de 1 a 10 mg, a un sujeto humano adulto de 70 kg. Típicamente, el corticosteroide, tal como un glucocorticoide, se administra en una cantidad entre aproximadamente 0,4 y 20 mg, por ejemplo, a o aproximadamente 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,75 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg o 20 mg por dosis, para un sujeto humano adulto promedio.

El corticosteroide se puede administrar, por ejemplo, a una dosificación de o de aproximadamente 0,001 mg/kg (del sujeto), 0,002 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,004 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,006 mg/kg, 0,007 mg/kg, 0,008 mg/kg, 0,009 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,035 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,045 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,055 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,065 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,085 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,095 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,50 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,60 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,70 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,80 mg/kg, 0,85 mg/kg, 0,90 mg/kg, 0,95 mg/kg, 1 mg/kg, 1,05 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,15 mg/kg, 1,20 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,35 mg/kg o 1,4 mg/kg, para un sujeto humano adulto promedio, típicamente con un peso de aproximadamente 70 kg a 75 kg.

La dosis administrada puede variar siempre y cuando la administración del corticosteroide mejore uno o más efectos secundarios adversos asociados con la administración de la enzima de degradación de hialuronano. En un ejemplo, la dosificación de glucocorticoide, por ejemplo, dexametasona, se administra en dosificaciones sucesivamente más bajas por ciclo de tratamiento. Por lo tanto, en tales regímenes de tratamiento, la dosis de corticosteroides se reduce gradualmente. Por ejemplo, la dexametasona se administra antes de la administración de una enzima de degradación de hialuronano, a una dosis inicial de 4 mg, y después de cada administración sucesiva de la enzima de degradación de hialuronano, la dosis de dexametasona se reduce, de manera que la dosis es de 3 mg para la próxima administración de la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., hialuronidasa PEGilada, a continuación 2 mg por administración de agente anti-hialuronano, p. ej., hialuronidasa PEGilada, y a continuación 1 mg por administración de agente anti-hialuronano, p. ej., hialuronidasa PEGilada. Se contempla cualquier dosis siempre que la dosis del corticosteroide sea eficaz para reducir uno o más efectos secundarios asociados con la administración de la enzima de degradación de hialuronano. p. ej., una hialuronidasa PEGilada.

El tiempo de administración puede variar siempre que la administración del corticosteroide mejore uno o más efectos secundarios adversos asociados con la administración de la enzima de degradación de hialuronano, tal como la hialuronidasa PEGilada. El corticosteroide se puede administrar secuencialmente, de forma intermitente, al mismo tiempo o en la misma composición que la enzima de degradación de hialuronano. p. ej., enzima de degradación de hialuronano PEGilada. Por ejemplo, el corticosteroide se puede administrar antes, durante, simultáneamente o después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., hialuronidasa PEGilada. En otro ejemplo, el corticosteroide y la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., la hialuronidasa PEGilada se administran de forma intermitente. Generalmente, el corticosteroide se administra antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., hialuronidasa PEGilada. Por ejemplo, el corticosteroide, p. ej., el glucocorticoide, tal como la dexametasona, se puede administrar o administrar aproximadamente 0,5 minutos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas o más antes de la administración del agente anti-hialuronano, por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano PEGilada.

En algunos ejemplos, el corticosteroide se administra al mismo tiempo que la administración de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano PEGilada. En este ejemplo, el corticosteroide se puede administrar junto con, o por separado, de la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., una hialuronidasa PEGilada. Normalmente, el corticosteroide se administra por separado de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano PEGilada. En otros ejemplos, el corticosteroide se administra aproximadamente a los 0,5 minutos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5

minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas 36 horas o más después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano PEGilada.

En un ejemplo, el corticosteroide se administra antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo una hialuronidasa PEGilada. Por ejemplo, el corticosteroide, p. ej., glucocorticoide, por ejemplo, dexametasona, se administra 1 hora antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., una hialuronidasa PEGilada. En otro ejemplo, el corticosteroide se administra 5 minutos antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., una enzima de degradación de hialuronano PEGilada. En otro ejemplo, el corticosteroide se administra antes y después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., una hialuronidasa PEGilada. En este ejemplo, el corticosteroide, tal como la dexametasona, se administra de uno a cinco minutos inmediatamente antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., una enzima de degradación de hialuronano PEGilada y ocho horas después de la administración del agente anti-hialuronano, p. ej., una enzima de degradación de hialuronano PEGilada. En otro ejemplo, un corticosteroide, tal como la dexametasona, se administra una hora antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p. ej., una enzima de degradación de hialuronano PEGilada y ocho a doce horas después de la administración del agente anti-hialuronano, p. ej., una enzima de degradación de hialuronano PEGilada.

Se contempla cualquier régimen de dosificación siempre que el tiempo de dosificación del corticosteroide mejore uno o más efectos secundarios asociados con la administración de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo una hialuronidasa PEGilada. Además, la dosis o el régimen de dosificación de corticosteroides es uno que no interfiere ni reduce el efecto terapéutico de la enzima de degradación de hialuronano u otro agente en las composiciones y combinaciones proporcionadas en la presente memoria, incluyendo el tratamiento de un cáncer o un tumor sólido.

Como se describe y se muestra en los ejemplos, la administración de un corticosteroide, tal como un glucocorticoide, tal como la dexametasona, no disminuye la eficacia de la terapia con inhibidores de puntos de control, tales como los anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD-L1, cuya eficacia es mejorada por la administración con una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, tal como PEGPH20, particularmente si la enzima de degradación de hialuronano, se administra 8-24 horas o se administra aproximadamente 8-24 horas antes de la administración del anticuerpo.

b. Agentes anticancerosos y otros tratamientos

La terapia combinada proporcionada en la presente memoria se puede utilizar sola o combinada adicionalmente con otros agentes anticancerosos. El agente o los agentes o el tratamiento o los tratamientos contra el cáncer pueden ser cirugía, radiación, fármacos, agentes quimioterapéuticos, polipéptidos, anticuerpos, péptidos, moléculas pequeñas o vectores de terapia génica, virus, ADN, vacunas, antígenos asociados a tumores, tales como células dendríticas que expresan uno o más cualesquiera de los antígenos asociados a tumores descritos en la presente memoria (Sección G) o conocidos en la técnica.

Los agentes anticancerosos ilustrativos que se pueden administrar después, coincidentemente con o antes de la administración de la terapia combinada de la presente memoria, incluyen, pero no se limitan a,

Acivicinas; Avicina; Aclarrubicinas; Acodazoles; Acroninas; Adozelesinas; Aldesleuquinas; Alemtuzumab; Alitretinoínas (Ácido 9-Cis-Retinoico); Alopurinoles; Altretaminas; Alvocidib; Ambazonas; Ambomininas; Ametantronas; Amifostinas; Aminoglutetimidias; Amsacinas; Anastrozoles; Anaxironas; Ancitabinas; Antramycinas; Apazicuas; Argimesnas; Trióxidos de arsénico; Asparraginasas; Asperlinas; Atrimustinas; Azacitidinas; Azetepas; Azotomicinas; Banoxantronas; Batabulinas; Batimastat; BCG Vivo; Benaxibinas; Bendamustinas; Benzodepas; Bexaroteno; Bevacizumab; Bicalutamidas; Bietaserpinas; Biricodar; Bisantrénos; Dimesilatos de Bisnafida; Bizelesinas; Bleomicinas; Bortezomib; Brequinar; Bropiriminas; Budotitanos; Busulfanos; Cactinomicinas; Calusteronas; Canertinib; Capecitabinas; Caracemidas; Carbetímeros; Carboplatinos; Carbocuas; Carmofur; Carmustinas con Polifeprosan; Carmustinas; Carrubicinas; Carzelesinas; Cedefingoles; Celecoxib; Cemadotinas; Clorambucilos; Cioteronel; Ciplatinos; Cirolemicinas; Cisplatinos; Cladribinas; Clanfenu; Clofarabinas; Crisnatoles; Ciclofosfamidias; Citarabinas Liposomales; Citarabinas; Dacarbazinas; Dactinomicinas; Darbepoetinas Alfa; Daunorrubicinas Liposomales; Daunorrubicinas/Daunomicinas; Daunorrubicinas; Decitabinas; Denileucina Diftitox; Dextrinulidipinas; Dexonas; Dexrazoxanas; Dezaguaninas; Diazicuas; Dibrospidium; Dienogest; Dinalinas; Disermodia; Docetaxel; Dofequidar; Doxilfluridinas; Doxorubicinas Liposomales; Doxorubicina HCL; inyección de Doxorubicina HCL liposomal; Doxorubicinas; Droloxifenos; Propionatos de Dromostanolona; Duazomicinas; Ecomustinas; Edatrexatos; Edotecarinas; Eflornitinas; Elacridar; Elinafidas; Soluciones B de Elliott; Elsamitruccinas; Emitefur; Enloplatinos; Enpromatos; Enzastaurinas; Epiropidinas; Epirubicinas; Epoetinas alfa; Eptaloprost; Erbulozoles; Esorrubicinas; Estramustinas; Etanidazoles; Etoglucidos; Fosfatos de Etopósido; Etoposidos VP-16; Etopósidos; Etoprinas; Exemestanos; Exisulind; Fadrozoles; Fazarabines; Fenretinidas; Filgrastim; Floxuridinas; Fludarabinas; Fluorouracilos; 5-fluorouracilos; Fluoximesteronas; Flurocitabinas; Fosquidones; Fostriecinas;

Fostriecinas; Fotretaminas; Fulvestrant; Galarrubicinas; Galocitabinas; Gemcitabinas; Gemtuzumab/Ozogamicinas;
 Geroquinolas; Gimatecanos; Gimeracilos; Gloxazonas; Glufosfamidas; Acetatos de goserelina; Hidroxiureas;
 Ibritumomab/Tiuxetano; Idarrubicinas; Ifosfamidas; Ilmofosinas; Ilomastat; Mesilatos de imatinib; Imexonas;
 Improsulfanos; Indisulam; Inprocuonas; Interferones alfa-2; Interferones alfa-2b; Interferones Alfa; Interferones Beta;
 5 Interferones Gamma; Interferones; Interleuquina-2 y otras interleuquinas (incluyendo las interleuquinas
 recombinantes); Intoplicinas; Iobenguanos [131-1]; Iproplatinos; Irinotecán; Irsogladinas; Ixabepilonas; Cetotrexatos;
 L-alanosinas; Lanreotidas; Lapatinib; Ledoxantronas; Letrozoles; Leucovorinas; Leuprolidas; Leuprorelinas
 (Leuprorelidas); Levamisoles; Lexacalcitoles; Liarozoles; Lobaplatinos; Lometrexoles; Lomustinas/CCNU;
 Lomustinas; Lonafarnib; Losoxantronas; Lurtotecán; Mafosfamidas; Manosulfanos; Marimastat; Masoprocoles;
 10 Maytansinas; Mecloretaminas; Mecloretaminas/mostazas nitrogenadas; Acetatos de Megestrol; Megestroles;
 Melengestroles; Melfalán; Menogarilos; Mepitiostanos; Mercaptopurinas; 6-Mercaptopurina; Mesna; Metesind;
 Metotrexatos; Metoxsalenos; Metomidatos; Metoprinas; Meturedepas; Miboplatinos; Miproxifenos; Misonidazoles;
 Mitindomidas; Mitocarcinas; Mitocrominas; Mitoflaxonas; Mitogilinas; Mitoguazonas; Mitomalcinas; Mitomicina C;
 Mitomicinas; Mitoafidas; Mitoquidonas; Mitosper; Mitotanos; Mitoxantronas; Mitozolomidas; Mivobulinas;
 15 Mizoribinas; Mofarotenos; Mopidamoles; Mubritinib; Ácidos micofenólicos; Fenpropionatos de Nandrolona;
 Nedaplatinos; Nelzarabinas; Nemorrubicinas; Nitracinas; Nocodazoles; Nofetumomab; Nogalamincinas; Nolatrexed;
 Nortopixantronas; Octreótidos; Oprelvequinas; Ormaplatinos; Ortataxel; Oteracilos; Oxaliplatinos; Oxisuranos;
 Oxofenarsinas; Paclitaxel; Pamidronatos; Patubilonas; Pegademazas; Pegaspargasa; Pegfilgrastim; Peldesinas;
 Peliomicinas; Pelitrexoles; Pemetrexed; Pentamustinas; Pentostatinas; Peplomicinas; Perfosfamidas; Perifosinas;
 20 Picoplatinos; Pinafidas; Pipobromanos; Pisosulfanos; Pirfenidonas; Piroxantronas; Pixantronas; Plevitrexed;
 Plicamicinas; Plomestanos; Plomestanos; Porfímero sódico; Porfímeros; Porfíromicinas; Prednimustinas;
 Procarbazines; Propamidinas; Prospidios; Pumitepas; Puromicinas; Pirazofurinas; Quinacinas; Ranimustinas;
 Rasburicasas; Riboprinas; Ritrosulfanos; Rituximab; Rogletimidas; Roquinimex; Rufocromomicinas; Sabarubicinas;
 Safingoles; Sargramostim; Satraplatinos; Sebriplatinos; Semustinas; Simtrazenos; Sizofiranos; Sobuzoxanos;
 25 Sorafenib; Esparfosatos; Ácidos esparfósicos; Esparsomicinas; Espirogermanios; Espiromustinas; Espiropatinos;
 Espiropatinos; Escualaminas; Estreptonigrinas; Estreptovaricinas; Estreptozocinas; Sufosfamidas; Sulofenur; Malato
 de Sunitinib; 6-tioguanina (6-TG); Tacedinalinas; Talcos; Talisomicinas; Talimustinas; Tamoxifenos; Tariquidar;
 Tauomustinas; Tecogalanos; Tegafur; Teloxantronas; Temporfinas; Temozolomidas; Teniposidos/VM-26;
 Teniposidos; Teroxironas; Testolactonas; Tiamiprinas; Tioguaninas; Tiotepas; Tiamiprinas; Tiazofurinas; Tilomisoles;
 30 Tilonas; Timcodar; Timonacic; Tirapazaminas; Topixantronas; Topotecán; Toremifenos; Tositumomab;
 Trabectedinas (Ecteinascidina 743); Trastuzumab; Trestolonas; Tretinoínas/ATRA; Tricirbinas; Trilostanos;
 Trimetrexatos; Tetranitratos de Triplatino; Triptorelinas; Trofosfamidas; Tubulozoles; Ubenimex; Mostazas de Uracilo;
 Uredepas; Valrubicinas; Valspodar; Vapreotidas; Verteporfinas; Vinblastinas; Vincristinas; Vindesinas; Vinepidinas;
 Vinfluninas; Vinformidas; Vinglicinatos; Vinleucinoles; Vinleurosinas; Vinorelbina; Vinrosidinas; Vintriptoles;
 35 Vinzolidinas; Vorozoles; Xantomincinas A (Guameciclinas); Zeniplatinos; Zilascorb [2-H]; Zinostatinas; Zoledronato;
 Zorrubicinas; y Zosuquidar, por ejemplo:
 Aldesleuquinas (p. ej., PROLEUKIN®); Alemtuzumab (p. ej., CAMPATH®); Alitretinoína (p. ej., PANRETIN®);
 Alopurinolas (p. ej., ZYLOPRIM®); Altretaminas (p. ej., HEXALEN®); Amifostinas (p. ej., ETHYOL®); Anastrozoles
 (p. ej., ARIMIDEX®); Trióxidos de arsénico (p. ej., TRISENOX®); Asparraginasas (p. ej., ELSPAR®); BCG Vivo (p.
 40 ej., TICE® BCG); Bexarotenos (p. ej., TARGRETIN®); Bevacizumab (AVASTIN®); Bleomicinas (p. ej.,
 BLENOXANE®); Busulfán intravenoso (p. ej., BUSULFEX®); Busulfán oral (p. ej., MYLERAN®); Calusteronas (p. ej.,
 METHOSAR®); Capecitabinas (p. ej., XELODA®); Carboplatinos (p. ej., PARAPLATIN®); Carmustinas (p. ej.,
 BCNU®, BiCNU®); Carmustinas con Polifeprosanos (p. ej., Oblea de GLIADEL®); Celecoxib (p. ej., CELEBREX®);
 Clorambucilos (p. ej., LEUKERAN®); Cisplatinos (p. ej., PLATINOL®); Cladribinas (p. ej., LEUSTATIN®, 2-CdA®);
 45 Ciclofosfamidas (p. ej., CYTOXAN®, NEOSAR®); Citarabinas (p. ej., CYTOSAR-U®); Citarabinas Liposomales (p.
 ej., DepoCyt®); Dacarbazinas (p. ej., DTIC-Dome); Dactinomincinas (p. ej., COSMEGEN®); Darbepoietina Alfa (p.
 ej., ARANESP®); Daunorrubicinas liposomales (p. ej., DANUOXOME®); Daunorrubicinas/Daunomicinas (p. ej.,
 CERUBIDINE®); Denileucina Diftitox (p. ej., ONTAK®); Dexrazoxanos (p. ej., ZINECARD®); Docetaxel (p. ej.,
 TAXOTERE®); Doxorubicinas (p. ej., ADRIAMYCIN®, RUBEX®); Doxorubicina Liposomal, incluyendo inyección de
 50 Doxorubicina HCL liposomal (p. ej., DOXIL®); Propionatos de Dromostanolona (p. ej., DROMOSTANOLONE® y
 MASTERONE® Inyectable); Soluciones B de Elliott (p. ej., Elliott's B Solution®); Epirubicinas (p. ej., ELLENCE®);
 Epoetinas alfa (p. ej., EPOGEN®); Estramustinas (p. ej., EMCYT®); Fosfatos de Etopósido (p. ej., ETOPOPHOS®);
 Etoposidos VP-16 (p. ej., VEPESID®); Exemestanos (p. ej., AROMASIN®); Filgrastim (p. ej., NEUPOGEN®);
 Floxuridinas (p. ej., FUDR®); Fludarabinas (p. ej., FLUDARA®); Fluorouracilo incl. 5-FU (p. ej., ADRUCIL®);
 55 Fulvestrant (p. ej., FASLODEX®); Gemcitabinas (p. ej., GEMZAR®); Gemtuzumab/Ozogamicina (p. ej.,
 MYLOTARG®); Acetatos de goserelina (p. ej., ZOLADEX®); Hidroxiureas (p. ej., HYDREA®); Ibritumomab/Tiuxetan
 (p. ej., ZEVALIN®); Idarrubicinas (p. ej., IDAMYCIN®); Ifosfamidas (p. ej., IFEX®); Mesilatos de imatinib (p. ej.,
 GLEEVEC®); Interferones alfa-2a (p. ej., ROFERON-A®); Interferones alfa-2b (p. ej., INTRON A®); Irinotecán (p. ej.,
 CAMPTOSAR®); Letrozoles (p. ej., FEMARA®); Leucovorinas (p. ej., WELLCOVORIN®, LEUCOVORIN®);
 60 Levamisoles (p. ej., ERGAMISOL®); Lomustinas/CCNU (p. ej., CeeBU®); Mecloretaminas/mostazas nitrogenadas
 (p. ej., MUSTARGEN®); Acetatos de Megestrol (p. ej., MEGACE®); Melfalán/L-PAM (p. ej., ALKERAN®);
 Mercaptopurina, incluyendo 6-mercaptopurinas (6-MP; p. ej., PURINETHOL®); Mesna (p. ej., MESNEX®);
 Metotrexatos; Metoxsalenos (p. ej., UVADEX®); Mitomicinas C (p. ej., MUTAMYCIN®, MITOZYTREX®); Mitotanos
 (p. ej., LYSODREN®); Mitoxantronas (p. ej., NOVANTRONE®); Fenpropionatos de Nandrolona (p. ej., DURABOLIN-

50®); Nofetumomab (p. ej., VERLUMA®); Oprelvequinas (p. ej., NEUMEGA®); Oxaliplatinos (p. ej., ELOXATIN®); Paclitaxel (p. ej., PAXENE®, TAXOL®); Pamidronatos (p. ej., AREDIA®); Pegademasa (p. ej., ADAGEN®); Pegaspargasa (p. ej., ONCASPAR®); Pegfilgrastim (p. ej., NEULASTA®); Pentostatinas (p. ej., NIPENT®); Pipobromanos (p. ej., VERCYTE®); Plicamicina/mitramicinas (p. ej., MITHRACIN®); Porfímeros sódicos (p. ej., PHOTOFRIN®); Procarbazonas (p. ej., MATULANE®); Quinacinas (p. ej., ATABRINE®); Rasburicasas (p. ej., ELITEK®); Rituximab (p. ej., RITUXAN®); Sargramostim (p. ej., PROKINE®); Estreptozocinas (p. ej., ZANOSAR®); Malatos de Sunitinib (p. ej., SUTENT®); Talcos (p. ej., SCLEROSOL®); Tamoxifeno (p. ej., NOLVADEX®); Temozolomidas (p. ej., TEMODAR®); Teniposidos/VM-26 (p. ej., VUMON®); Testolactonas (p. ej., TESLAC®); Tioguaninas incluyendo, 6-tioguanina (6-TG); Tiotepas (p. ej., THIOPLEX®); Topotecán (p. ej., HYCAMTIN®); Toremifeno (p. ej., FARESTON®); Tositumomab (p. ej., BEXXAR®); Trastuzumab (p. ej., HERCEPTIN®); Tretinoínas/ATRA (p. ej., VESANOID®); Mostazas de Uracilo; Valrubicinas (p. ej., VALSTAR®); Vinblastinas (p. ej., VELBAN®); Vincristinas (p. ej., ONCOVIN®); Vinorelbina (p. ej., NAVELBINE®); y Zoledronatos (p. ej., ZOMETA®).

H. ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Generación de modelos de ratones con tumores singénicos con alto contenido hialuronano (HA)

A. Generación de un modelo de ratón con tumor de colon singénico con alto contenido de hialuronano (HA)

1. Generación de la línea celular CT26/HAS3 con alto contenido de hialuronano (HA)

Se modificaron células de carcinoma de colon de ratón Balb/c CT26 (ATCC, Núm. de catálogo CRL-2638) para que expresaran de forma constitutiva la hialuronano sintasa 3 (HAS3) humana. Se generó un vector de lentivirus, denominado pLV-EF1a-hHAS3-IRES-Hyg (SEQ ID NO: 1) insertando el ADNc de HAS3 (SEQ ID NO: 2) entre los sitios de restricción XbaI y MluI dentro del sitio de clonación múltiple de pLV EF1a-MCS-IRES-Hyg (BioSetia, Inc.; SEQ ID NO: 3). Las células CT26 se infectaron con el vector pLV-EF1a-hHAS3-IRES-Hyg resultante (SEQ ID NO: 1), y las células transducidas de forma estable, denominadas células CT26/HAS3, se seleccionaron mediante tratamiento con higromicina. Las células CT26/HAS3 se mantuvieron en cultivo de tejidos como una monocapa adherente en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM y suero bovino fetal al 10% a 37°C y 5% de CO₂.

2. Generación de un modelo de tumor CT26/HAS3 singénico

Las células parentales CT26/HAS3 o CT26 descritas en la parte 1 anterior se recogieron con tripsina a 80-90% de confluencia, se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) estéril y se diluyeron con HBSS a una concentración de 4×10^6 células/mL. Se obtuvieron ratones Balb/c macho a las 4-6 semanas de Taconic Farms y se alojaron 4/jaula. Para las inoculaciones de tumores, a los ratones se les inyectaron 50 µl de suspensión celular (2×10^5 células totales) intramuscularmente, adyacentes al periostio tibial derecho.

Los volúmenes de los tumores se midieron por ultrasonido utilizando VisualSonics Vevo 2100 (Toronto, Canadá) y el soporte lógico de obtención de imágenes Vevo 2100 v1.5.0. Los animales se anestesiaron utilizando anestesia ligera con isoflurano mientras se medían los volúmenes de los tumores. Para la medición del tumor, la región de interés se cubrió con gel de ultrasonido (Parker Laboratories, Fairfield, NJ) y el cabezal de exploración RMV-716 (profundidad focal = 17,5 mm) se colocó directamente sobre la región de interés. Mientras estaba en el modo 2D, se localizó el centro aproximado del tumor y, posteriormente se capturó una imagen (150 - 200 fotogramas) utilizando el modo 3D. Se analizaron aproximadamente 15-30 fotogramas de los 150-200 fotogramas y se calculó el volumen del tumor y se expresó en mm³.

3. Medición de los niveles de HA en el tejido tumoral

Al concluir los experimentos de crecimiento tumoral, los tumores se extirparon y las porciones se almacenaron congeladas a $\leq -60^\circ\text{C}$. Para obtener extractos para la cuantificación de HA, el tejido tumoral se digirió 24 horas a 55°C en un tubo basculante utilizando 40 µl por mg de tejido de una solución que contenía proteinasa K (Sigma, Núm. de catálogo P4850) a 1 mg/mL en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM y CaCl₂ 2 mM. La proteinasa K se inactivó a continuación por calor a 100°C durante 30 minutos, la solución resultante se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos a 4-10°C, y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de HA por medio de Hyaluronan Duo Set ELISA (R&D Systems, Núm. de catálogo DY3614) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La curva patrón se obtuvo utilizando una serie de dilución 1:3 de seis diluciones totales, comenzando a 90 ng/mL, y todas las muestras se diluyeron de tal manera que sus concentraciones resultantes estuvieron dentro del intervalo de 0,37 - 20 ng/mL. Utilizando este procedimiento, los tumores desarrollados a partir de células parentales CT26 de bajo

contenido de HA tenían 73 ± 8 ng de HA/mg de tejido, mientras que los tumores desarrollados a partir de células CT26/HAS3 de alto contenido de HA tenían 1087 ± 126 ng de HA/mg de tejido.

B. Generación de un modelo de ratón con tumor pancreático singénico con alto contenido de hialuronano (HA)

1. Generación de una línea celular MH194/HAS3 con alto contenido de hialuronano (HA)

Las células de carcinoma pancreático de ratón MH194 (derivadas del modelo de ratón modificado genéticamente Kras^{LSL.G12D/+}p53^{R172H/+}PdxCretg⁺) se modificaron para que expresaran constitutivamente la hialuronano sintetasa humana 3 (HAS3) como en el Ejemplo 1A. Las células transducidas establemente, denominadas células MH194/HAS3, se seleccionaron mediante tratamiento con higromicina. Las células MH194/HAS3 y MH194 parentales se mantuvieron en cultivo de tejidos como una monocapa adherente en medio DMEM con un suplemento de L-glutamina 2 mM y suero bovino fetal al 10% a 37°C y 5% de CO₂.

2. Aislamiento e immortalización de células estrelladas pancreáticas

El páncreas de los ratones C57BL/6 se picó con cuchillas de afeitar y se colocó en 2 mL de un tampón de digestión que contenía collagenasa P al 0,05%, ADNasa al 0,1% y pronasa al 0,02% en la solución salina equilibrada de Gey (GBSS). Después de dos incubaciones de digestión de 15 minutos a 37°C con un mezclado exhaustivo después de cada incubación, la suspensión celular resultante se filtró a través de una malla de nailon de 100 µm, se lavó dos veces en GBSS con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,3% y se resuspendió en 10 mL de GBSS/BSA. Se añadieron ocho mL de Histodenz (Sigma, Núm. de catálogo D2158) a la suspensión celular, y todo el volumen se pipeteó bajo 6 mL de GBSS/BSA para generar un gradiente de densidad discontinua. Después de la centrifugación durante 20 minutos a 1.400 g con el freno puesto a cero, las células deseadas se recolectaron de la interfase entre los dos volúmenes de densidad y se lavaron una vez con PBS y una vez con medio DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10%, y anfotericina B al 1% (DMEM completa). Las células se immortalizaron utilizando Lenti-SV40 (Capital Biosciences, Núm. de catálogo CIP-0011) utilizando el protocolo del fabricante. La línea celular resultante, denominada PSC4, se mantuvo en cultivo de tejidos como una monocapa adherente en DMEM completo a 37°C y 5% de CO₂.

3. Generación de un modelo de tumor MH194/HAS3 singénico

Las células MH194/HAS3 descritas en la parte A anterior se recogieron con tripsina a una confluencia de 80-90%, se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) estéril y se diluyeron con HBSS a una concentración de 4×10^6 células/mL. Se obtuvieron ratones C57BL/6 macho a las 4-6 semanas de Taconic Farms y se alojaron 4/jaula. Para las inoculaciones de tumores, a los ratones se les inyectaron 50 µL de suspensión celular que contenía 2×10^5 Células MH194/HAS3 o células MH194 parentales junto con 5×10^5 PSC4 (7×10^5 células totales) intramuscularmente, adyacentes al periostio tibial derecho.

Los volúmenes tumorales se midieron por ultrasonido como en el Ejemplo 1A2. Se analizaron aproximadamente 15-30 fotogramas de 150-200 fotogramas y se calculó el volumen de tumor y se expresó en mm³. Cuando se utilizó el procedimiento de cuantificación de HA descrito en el Ejemplo 1A3, los tumores desarrollados a partir de células PS194+MH194 parentales contenían 263 ± 16 ng de HA/mg de tejido, mientras que los tumores desarrollados a partir de células MH194/HAS3+PSC4 contenían 1783 ± 99 ng de HA/mg de tejido.

Ejemplo 2

Generación de un modelo de ratón con tumor de xenoinjerto humano de alto contenido de HA

A. Generación de la línea celular SKOV3/HAS2 con alto contenido de hialuronano (HA)

Se modificaron células de cáncer de ovario humano SKOV3 (ATCC, Núm. de catálogo HTB-77) para expresar de forma constitutiva la hialuronano sintetasa humana 2 (HAS2). Se insertó el ADNc de HAS2 (SEQ ID NO: 317) entre los sitios de restricción XbaI y MluI dentro del sitio de clonación múltiple del vector de lentivirus pLV-EF1a-MCS-IRES-Hyg (BioSetia, Inc.; SEQ ID NO: 3) para generar el vector pLV-EF1a-hHAS2-IRES-Hyg. Las células SKOV3 se infectaron con el vector resultante. Las células transducidas establemente, denominadas células SKOV3/HAS2, se seleccionaron mediante tratamiento con higromicina. Las células SKOV3/HAS2 se mantuvieron en cultivo de tejidos como una monocapa adherente en medio 5A de McCoy con un suplemento de L-glutamina 2 mM y suero bovino fetal al 10% a 37°C y 5% de CO₂.

B. Modelo de ratón con tumor de xenoinjerto SKOV3/HAS2

Las células SKOV3/HAS2, descritas en la parte A anterior, se recogieron con tripsina a una confluencia de 80-90%,

se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) estéril y se diluyeron con HBSS a una concentración de 100×10^6 células/mL. Se obtuvieron ratones hembra atímicos (nu/nu) a las 4-6 semanas de Taconic Farms y se alojaron 4/jaula. Para las inoculaciones de tumores, a los ratones se les inyectaron 50 μ L de suspensión celular (5×10^6 células totales) intramuscularmente, adyacentes al periostio tibial derecho. Los volúmenes tumorales se midieron como se describe en el Ejemplo 1B anterior.

Utilizando el procedimiento de cuantificación de HA descrito en el Ejemplo 1A3, los tumores desarrollados a partir de células SKOV3/HAS2 contenían 2343 ± 199 ng de HA/mg de tejido.

Ejemplo 3

Producción y purificación de PH20 humana recombinante (rHuPH20)

A. Generación de una línea celular que expresa rHuPH20 soluble inicial

Las células de ovario de hámster chino (CHO) se transfectaron con el plásmido HZ24 (expuesto en SEQ ID NO: 4). El vector plasmídico HZ24 para la expresión de rHuPH20 soluble contiene un esqueleto del vector pCI (Promega), ADN que codifica los aminoácidos 1-482 de la hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO: 5), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech), y el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) del ratón. El esqueleto del vector pCI también incluye el gen de resistencia a la ampicilina (AmpR), un origen de replicación de fl, una región de potenciador/promotor temprano inmediato de Citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica la construcción de rHuPH20 soluble contiene un sitio NheI y una secuencia consenso de Kozak antes del ADN que codifica la metionina en la posición de aminoácido 1 de la secuencia de señal de 35 aminoácidos nativa de la PH20 humana, y un codón de parada que sigue al ADN que codifica la tirosina. correspondiente a la posición de aminoácido 482 de la hialuronidasa PH20 humana expuesta en SEQ ID NO: 6), seguido de un sitio de restricción BamHI. La construcción pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por lo tanto, da como resultado una única especie de ARNm dirigida por el promotor de CMV que codifica los aminoácidos 1-482 de PH20 humana (expuesta en SEQ ID NO: 7) y los aminoácidos 1-186 de la dihidrofolato reductasa de ratón (expuesta en SEQ ID NO: 8) separados por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

Las células CHO no transfectadas que crecían en medios CD-CHO modificados de GIBCO para células DHFR(-), con un suplemento de glutamina 4 mM y 18 mL/L de Pluronic F68/L (Gibco), se sembraron a $0,5 \times 10^6$ células/mL en un matraz oscilante en preparación para la transfección. Las células se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂ en una incubadora humidificada, con movimiento oscilante a 120 rpm. Las células CHO no transfectadas en crecimiento exponencial se sometieron a prueba para determinar la viabilidad antes de la transfección.

Se sedimentaron sesenta millones de células viables del cultivo de células CHO no transfectadas y se resuspendieron a una densidad de 2×10^7 células en 0,7 mL de tampón de transfección 2x (2x HeBS: HEPES 40 mM, pH 7,0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,4 mM, dextrosa 12 mM). A cada alícuota de células resuspendidas, se le añadieron 0,09 mL (250 μ g) del plásmido HZ24 lineal (linealizado por medio de digestión durante la noche con ClaI (New England Biolabs)), y las soluciones de células/ADN se transfirieron a cubetas de electroporación BTX con una ranura de 0,4 cm (Gentronics) a temperatura ambiente. Se realizó una electroporación de control negativa sin ADN plasmídico mezclado con las células. Las mezclas de células/plásmidos se sometieron a electroporación con una descarga de condensador de 330 V y 960 μ F o a 350 V y 960 μ F.

Las células se retiraron de las cubetas después de la electroporación y se transfirieron a 5 mL de medio CD-CHO modificado para células DHFR(-), se les añadió un suplemento de glutamina 4 mM y 18 mL/L de Pluronic F68/L (Gibco), y se dejaron crecer un pocillo de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos sin selección durante 2 días a 37°C en 5% de CO₂ en una incubadora humidificada.

Dos días después de la electroporación, se retiraron 0,5 mL de medio de cultivo de tejido de cada pocillo y se sometieron a prueba para determinar la presencia de actividad hialuronidasa utilizando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 4. Se recogieron células que expresaban los niveles más altos de actividad hialuronidasa del pocillo de cultivo de tejido, se sometieron a recuento y se diluyeron 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 de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos. Se agregaron cien microlitros de medio CD-CHO (GIBCO) que contenía GlutaMAX™-1 4 mM (GIBCO™, Invitrogen Corporation) y sin suplementos de hipoxantina y timidina a los pocillos que contenían las células (volumen final: 0,2 mL).

Se identificaron diez clones de las 5 placas cultivadas sin metotrexato. Seis de estos clones HZ24 se expandieron en cultivo y se transfirieron a matraces oscilantes en forma de suspensiones de células individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 y 4D10 se colocaron en placas de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos utilizando una estrategia de dilución infinita bidimensional en la que las células se diluyeron 1:2 hacia abajo en la placa y 1:3 transversalmente en la placa. comenzando en 5.000 células en el pocillo superior izquierdo. Los clones diluidos se

cultivaron en un fondo de 500 células DG44 CHO no transfectadas por pocillo, para proporcionar los factores de crecimiento necesarios para los días iniciales al cultivo. Se prepararon diez placas por subclón, con 5 placas que contenían metotrexato 50 nM y 5 placas sin metotrexato.

- 5 El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales (13 del tratamiento sin metotrexato y 11 del tratamiento con metotrexato 50 nM). Se midió la actividad hialuronidasa significativa en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (> 50 Unidades/mL), y estos 8 subclones se expandieron en matraces de cultivo de tejidos T-25. Los clones aislados del protocolo de tratamiento con metotrexato se expandieron en presencia de metotrexato 50 nM. El clon 3D35M se expandió adicionalmente en metotrexato 500 nM en matraces oscilantes y dio lugar a clones que produjeron más de 10 1.000 Unidades/mL de actividad hialuronidasa (clon 3D35M; o Gen1 3D35M). Después se preparó un banco de células maestras (MCB) de las células 3D35M.

B. Generación de una línea celular de segunda generación que expresa rHuPH20 soluble

- 15 La línea celular Gen1 3D35M, descrita en la parte A anterior, se adaptó a niveles más altos de metotrexato para producir clones de generación 2 (Gen2). Se sembraron células 3D35M a partir de cultivos que contenían metotrexato establecidos en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 1,0 µM. Las células se adaptaron a un nivel más alto de metotrexato haciéndolas crecer y pasándolas 9 veces durante un período de 46 días en una incubadora humidificada a 37°C, 7% de CO₂. La población de células amplificada se clonó mediante dilución 20 limitante en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos que contenían medio con metotrexato 2,0 µM. Después de aproximadamente 4 semanas, se identificaron los clones y se seleccionó el clon 3E10B para la expansión. Las células 3E10B se hicieron crecer 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 se utilizó para estudios posteriores.

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

- 35 Las células 2B2 resultantes son células DG44 CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20). La PH20 soluble está presente en las células 2B2 a un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis de transferencia Southern del ADN genómico de las células 2B2 digeridas con SpeI, XbaI y BamHI/HindIII utilizando una sonda específica para rHuPH20 reveló el siguiente perfil de digestión con enzimas de restricción: una banda de hibridación principal de ~7,7 kb y cuatro bandas de hibridación 40 menores (~13,9, ~6,6, ~5,7 y ~4,6 kb) con ADN digerido con SpeI; una banda de hibridación principal de ~5 kb y dos bandas de hibridación menor (~13,9 y ~6,5 kb) con ADN digerido con XbaI; y una única banda de hibridación de ~1,4 kb observada utilizando ADN de 2B2 digerido con BamHI/HindIII. El análisis de la secuencia del transcrito de ARNm indicó que el ADNc derivado (SEQ ID NO: 9) era idéntico a la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 5) excepto por una diferencia en un par de bases en la posición 1.131, que se observó que era una timidina (T) en lugar de la 45 citosina esperada (C). Esta es una mutación silenciosa, sin efecto sobre la secuencia de aminoácidos.

C. Producción de rHuPH20 soluble de Gen 2 en 300 L de cultivo celular con biorreactor

- 50 Se descongeló un vial de células HZ24-2B2 (descrito en la parte B anterior) y se expandió desde matraces oscilantes a través de matraces giratorios de 36 L en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) con un suplemento de metotrexato 20 µM y GlutaMAX-1™ (Invitrogen). Brevemente, se descongeló un vial de células en un baño de agua a 37°C, se añadió medio y se centrifugaron las células. Las células se resuspendieron en un matraz oscilante de 125 mL con 20 mL de medio de nueva aportación y se colocaron en una incubadora a 37°C, 7% de CO₂. El volumen se aumentó a 40 mL en el matraz oscilante de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzó más de 1,5 x 10⁶ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. El matraz fue incubado a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de 1,5 x 10⁶ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 250 mL en un volumen de cultivo de 200 mL y el matraz se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de 1,5 x 10⁶ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 1 L en un volumen de cultivo de 800 mL y se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de 1,5 x 10⁶ células/mL el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 6 L en un volumen de cultivo de 5.000 mL y se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de 1,5 x 10⁶ células/mL el cultivo se expandió en un matraz de 36 L en un volumen de cultivo de 32 L y se incubó a 37°C, 7% de CO₂.

Se esterilizó un reactor de 400 L y se le añadieron 230 mL de medio CD-CHO. Antes de su uso, el reactor fue revisado para verificar la presencia de contaminación. Se transfirieron aproximadamente 30 L de células de los matraces giratorios 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 el punto de ajuste de la temperatura, 37°C; Velocidad del impulsor 40-55 RPM; Presión del Recipiente: 0,20 atm; Purgado de aire 0,5-1,5 L/Min.; Superposición 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 de proteínas y la retención. Además, durante la ejecución, se añadieron alimentaciones de nutrientes. A las 120 h (día 5), se añadieron 10,4 L de medio de alimentación núm. 1 (4 x CD-CHO + 33 g/L glucosa + 160 mL/L GlutaMAX-1™ + 83 mL/L Yeastolate + 33 mg/L insulina rHu). A las 168 horas (día 7), se añadieron 10,8 litros de Alimentación núm. 2 (2 x CD-CHO + 33 g/L de glucosa + 80 mL/L de GlutaMAX-1™ + 167 mL/L de Yeastolate + 0,92 g/L de butirato de sodio) añadido, y la temperatura de cultivo se redujo a 36,5°C. A las 216 horas (día 9), se añadieron 10,8 litros de alimentación núm. 3 (1 x CD-CHO + 50 g/L de glucosa + 50 mL/L de GlutaMAX-1™ + 250 mL/L de Yeastolate + 1,80 g/L de butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se redujo a 36°C. A las 264 horas (día 11), se añadieron 10,8 litros de alimentación núm. 4 (1 x CD-CHO + 33 g/L de glucosa + 33 mL/L de GlutaMAX-1™ + 250 mL/L de Yeastolate + 0,92 g/L de butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se redujo a 35,5°C. Se observó que la adición de los medios de alimentación mejoraba drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de producción. Se recogió la cosecha del reactor a los 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células cayó por debajo de 40%. El proceso dio como resultado una productividad final de 17.000 unidades por mL con una densidad celular máxima de 12 millones de células/mL. En la cosecha, se tomaron muestras del cultivo para detectar micoplasma, carga biológica, endotoxina y virus *in vitro* e *in vivo*, Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y actividad enzimática.

El cultivo se bombeó por medio de una bomba peristáltica a través de cuatro módulos del sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, conteniendo cada uno de los cuales 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 de una membrana de celulosa, a continuación a través de un segundo sistema de filtración Millistak (Millipore) único 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 de una membrana de celulosa y a continuación a través de un filtro de 0,22 µm final en una bolsa flexible estéril de un solo uso con una capacidad de 350 L. El fluido de cultivo celular recogido se complementó con EDTA 10 mM y Tris 10 mM a un pH de 7,5. El cultivo se concentró 10x con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) utilizando cuatro filtros de polietersulfona (PES) (Sartorius) de corte de peso molecular (PMC) de 30 kDa, seguido de un intercambio de tampón 10x con Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 en un filtro final de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 50 L.

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

D. Purificación de rHuPH20 soluble Gen2

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

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

Se preparó una columna de boronato de aminofenilo (ProMedics). Se recogió el lavado y se tomaron muestras para

determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. El flujo directo de PS que contenía la proteína purificada se cargó sobre la columna de boronato de aminofenilo a una velocidad de flujo de 100 cm/hora. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. La columna se lavó con bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0. La columna se lavó con bicina 20 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 9,0. La proteína se hizo eluir con HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6,9 y se hizo pasar a través de un filtro estéril a una bolsa estéril. La muestra eluida se sometió a prueba para determinar la carga biológica, la concentración de proteínas y la actividad enzimática.

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

La proteína purificada por HAP se hizo pasar a continuación a través de un filtro de eliminación de virus. El filtro Virosart® esterilizado (Sartorius) se preparó primero lavando con 2 L de fosfato potásico 70 mM, pH 7,0. Antes del uso, se tomaron muestras del tampón filtrado para determinar el pH y la conductividad. La proteína purificada por HAP se bombeó a través de una bomba peristáltica a través del filtro de eliminación de virus 20 nM. La proteína filtrada en fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 se hizo pasar a través de un filtro final de 0,22 μm a una bolsa estéril. La muestra sometida a filtración de virus se analizó para determinar la concentración de proteínas, la actividad enzimática, el oligosacárido, el monosacárido y el perfilado de ácido siálico. La muestra también se analizó para detectar impurezas relacionadas con el procedimiento.

Ejemplo 4

Determinación de la actividad de hialuronidasa de rHuPH20 soluble

Se determinó la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble en muestras tales como cultivos celulares, plasma, fracciones de purificación y soluciones purificadas mediante un ensayo turbidimétrico, que se basaba en la formación de un producto precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con la albúmina sérica, o un ensayo de sustrato de ácido hialurónico biotinilado, que mide la cantidad de rHuPH20 o PEGPH20 enzimáticamente activas mediante la digestión del sustrato de ácido hialurónico biotinilado (b-HA) unido de forma no covalente a placas de microtitulación de múltiples pocillos de plástico.

A. Ensayo de microturbidez

La actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble se mide incubando rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un período de tiempo establecido (10 minutos) y a continuación precipitando el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina sérica acidulada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un período de desarrollo de 30 minutos. La disminución de 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 utilizando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de trabajo del ensayo de rHuPH20 soluble, y las mediciones de la actividad de la muestra se realizan en relación con esta curva de calibración.

Las diluciones de la muestra se prepararon en Soluciones Diluyentes de Enzimas. La Solución Diluyente de Enzima se preparó 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 agua estéril para inyectables (SWFI), y diluyendo 0,2 mL de solución de Buminat al 25% en la mezcla y sometiendo a agitación vorticial durante 30 segundos. Esto se realizó dentro del margen de 2 horas antes del uso y se almacenó en hielo hasta que fue necesario. Las muestras se diluyeron a 1-2 U/mL estimadas. En general, la dilución máxima por etapa no excedió 1:100 y el tamaño inicial de la muestra para la primera dilución no fue inferior a 20 μL . Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para realizar el ensayo fueron los siguientes: Muestras en proceso, Fracciones de FPLC: 80 μL ; Sobrenadantes de cultivo de tejidos: 1 mL; Material concentrado: 80 μL ; Material de la etapa final o purificado: 80 μL . Las diluciones se realizaron por triplicado en una placa de 96 pocillos de Baja Unión a Proteína y se transfirieron 30 μL de cada dilución a las placas de fondo transparente/negro Optilux (BD BioSciences).

Se prepararon diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2,5 U/mL en Solución Diluyente de Enzima para generar una curva patrón y se añadieron a la placa Optilux por triplicado. Las diluciones incluyeron 0 U/mL, 0,25 U/mL, 0,5 U/mL, 1,0 U/mL, 1,5 U/mL, 2,0 U/mL y 2,5 U/mL. Los pocillos de "Blanco reactivo" que

contenían 60 µL de Solución Diluyente de Enzima se incluyeron en la placa como control negativo. A continuación se cubrió la placa y se calentó sobre un bloque térmico durante 5 minutos a 37°C. Se retiró la cubierta y se agitó la placa durante 10 segundos. Después de someter a movimiento oscilante, la placa se devolvió al bloque térmico y el Dispositivo de Manejo de Líquidos MULTIDROP 384 se cebó con la solución tibia de hialuronato de sodio de 0,25 mg/mL (preparada disolviendo 100 mg de hialuronato de sodio (LifeCore Biomedical) en 20,0 mL de SWFI. Esto se mezcló girando suavemente y/o meciendo a 2-8°C durante 2-4 horas, o hasta que estuvo completamente disuelto). La placa de reacción se transfirió al MULTIDROP 384 y la reacción se inició al presionar la tecla de inicio para dispensar 30 µL de hialuronato de sodio en cada pocillo. Después se retiró la placa del MULTIDROP 384 y se sometió a movimiento oscilante durante 10 segundos antes de transferirla a un bloque térmico con la cubierta de la placa reemplazada. La placa se incubó a 37°C durante 10 minutos.

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

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

B. Ensayo de hialuronano biotinilado

El ensayo de ácido hialurónico biotinilado mide la cantidad de rHuPH20 o PEGPH20 enzimáticamente activas en muestras biológicas mediante la digestión de un sustrato de ácido hialurónico biotinilado (b-HA) de elevado peso molecular (~ 1,2 megadalton) unido de forma no covalente a placas de microtitulación de múltiples pocillos. La rHuPH20 o la PEGPH20 en los patrones y las muestras se dejan incubando en una placa recubierta con b-HA a 37°C. Después de una serie de lavados, el b-HA no escindido/unido restante se trata con producto conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano picante (SA-HRP). La reacción entre SA-HRP inmovilizado y el sustrato cromogénico, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), produce una solución de color azul. Después de detener la reacción con ácido, se determina la formación del producto de reacción amarillo soluble leyendo la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placa de microtitulación. La disminución de la absorbancia a 450 nm que resulta de la actividad de la enzima en el sustrato de ácido hialurónico biotinilado (b-HA) es una medida de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble. El método se realiza utilizando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de rHuPH20 soluble o PEGPH20, y las mediciones de la actividad de la muestra se realizan en relación con esta curva de calibración.

Las diluciones de la muestra y el calibrador se prepararon en Diluyente de Ensayo. El Diluyente de Ensayo se preparó agregando un 1% v/v de plasma reunido (de la especie apropiada) a un BSA al 0,1% (p/v) en HEPES, pH 7,4. Esto se preparó diariamente y se almacenó a 2-8°C. Dependiendo del tipo de especie, así como del nivel de hialuronidasa previsto, se prepararon diluciones simples o múltiples para garantizar que al menos una dilución de la muestra caería dentro del intervalo de la curva de calibración. Para guiar la selección de las diluciones de la muestra de prueba, se utilizó información conocida sobre la dosis de hialuronidasa administrada, la vía de administración, el volumen de plasma aproximado de la especie y el momento puntual para estimar los niveles de actividad hialuronidasa. Cada dilución de la muestra se mezcló a medida que se preparaba mediante un breve pulso de agitación vorticial y se cambiaron las puntas de las pipetas entre cada dilución. En general, las diluciones comenzaron con una dilución inicial de 50 o 100 veces seguidas por diluciones en serie adicionales. Se preparó una curva de calibración de siete puntos de rHuPH20 o PEGPH20 (dependiendo del tratamiento administrado) con una concentración que oscilaba entre 0,004 y 3,0 U/mL para rHuPH20 y entre 0,037 y 27 U/mL para PEGPH20. Se aplicaron cien microlitros (100 µL) de cada dilución de la muestra de prueba y el punto de la curva de calibración a pocillos por triplicado de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Immulon 4HBX, Thermo) que se había recubierto previamente con 100 µL por pocillo de b-HA 0,1 mg/mL y se bloquearon con 250 µL de albúmina de suero bovino al 1,0% (p/v) en PBS. Las placas se cubrieron con un sello de placa adhesivo y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 90 minutos. Al final del período de incubación, el sello adhesivo se retiró de la placa, las muestras se aspiraron y la placa se lavó cinco (5) veces con 300 µL por pocillo de Tampón de Lavado (tampón fosfato 10 mM, cloruro potásico 2,7 mM, cloruro de sodio 137 mM, pH 7,4, con Tween 20 al 0,05% (v/v), PBST) utilizando un lavador de placas automático (BioTek ELx405 Select CW, Programa '4HBX1'). Se añadieron cien microlitros de Solución de Trabajo de producto conjugado de estreptavidina-HRP [producto conjugado de estreptavidina-HRP (1:5.000 v/v) en Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 137 mM, Tween 20 al 0,025% (v/v), albúmina de suero bovino al 0,1% (w/v)] por pocillo. La placa se selló y se dejó incubando a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos sin movimiento oscilante y se protegió de la luz. Al final del período de incubación, el sello adhesivo se retiró de la placa, las muestras se aspiraron y la placa se lavó cinco (5) veces con 300 µL por pocillo de Tampón de Lavado como se

ha descrito anteriormente. Se añadió solución TMB (a temperatura ambiente) a cada pocillo y se dejó incubando protegida de la luz durante aproximadamente cinco (5) minutos a temperatura ambiente. La solución de Parada TMB (KPL, número de catálogo 50-85-06) se agregó a continuación a 100 µL por pocillo. La absorbancia de cada pocillo a 450 nm se determinó utilizando un espectrofotómetro de placa de microtitulación. La respuesta de la Curva de Calibración en cada placa se modeló mediante un ajuste de curva logística de 4 parámetros. La actividad hialuronidasa de cada incógnita se calculó por interpolación a partir de la curva de calibración, se corrigió por el factor de dilución de la muestra y se refirió en U/mL.

Ejemplo 5

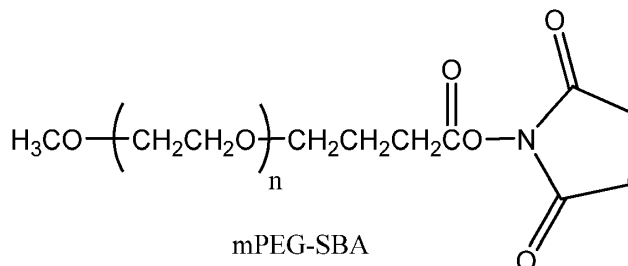
PEGilación de rHuPH20

Se PEGiló rHuPH20 (PEGPH20) por reacción de la enzima con el éster N-hidroxisuccinimidílico lineal del ácido metoxipoli(etilenglicol) butanoico (mPEG-SBA-30K).

A. Conjugación de mPEG-SBA-30K a rHuPH20

Se conjugó covalentemente rHuPH20 (que tiene un tamaño de aproximadamente 60 kDa), generado como se describe en el Ejemplo 3, con un éster N-hidroxisuccinimidílico lineal de ácido metoxipoli(etilenglicol)butanoico (mPEG-SBA-30K), con un peso molecular aproximado de 30 kDa. La estructura de mPEG-SBA se muestra en el esquema 2, a continuación:

Esquema 2



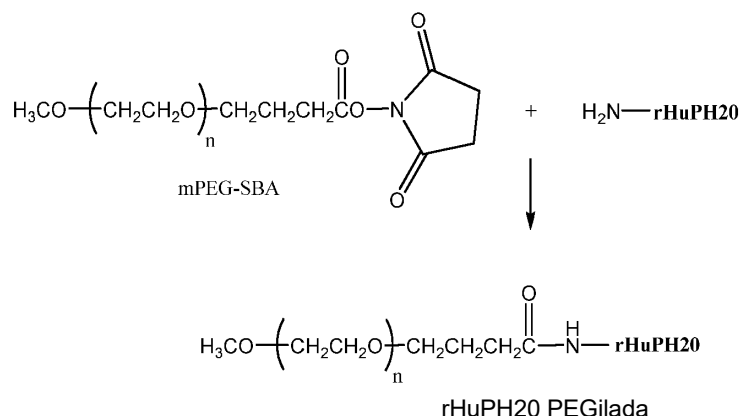
Los métodos utilizados para preparar el mPEG-SBA-30K que se utilizó para PEGilar la rHuPH20 se describen, por ejemplo, en el documento U.S. 5.672.662. Brevemente, el mPEG-SBA-30K se elabora de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Una solución de etilmalonato (2 equivalentes) disuelto en dioxano se añade gota a gota a hidruro de sodio (2 equivalentes) y tolueno bajo una atmósfera de nitrógeno. El metanosulfonato de mPEG (1 equivalente, PM 30 kDa, Shearwater) se disuelve en tolueno y se añade a la mezcla anterior. La mezcla resultante se calienta a reflujo durante aproximadamente 18 horas. La mezcla de reacción se concentra a la mitad de su volumen original, se extrae con una solución acuosa de NaCl al 10%, se extrae con ácido clorhídrico acuoso al 1% y los extractos acuosos se combinan. Las capas acuosas recogidas se extraen con diclorometano (3x) y la capa orgánica se seca con sulfato de magnesio, se filtra y se evapora hasta sequedad. El residuo resultante se disuelve en hidróxido de sodio 1 N que contiene cloruro de sodio y la mezcla se agita durante 1 hora. El pH de la mezcla se ajusta a aproximadamente 3 por adición de ácido clorhídrico 6N. La mezcla se extrae con diclorometano (2x).

La capa orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra, se concentra y se vierte en dietil éter frío. El producto precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío. El compuesto resultante se disuelve en dioxano y se somete a reflujo durante 8 horas y a continuación se concentra hasta sequedad. El residuo resultante se disuelve en agua y se extrae con diclorometano (2x), se seca sobre sulfato de magnesio y la solución se concentra por evaporación rotatoria y a continuación se vierte en dietil éter frío. El producto precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío. El compuesto resultante (1 equivalente) se disuelve en diclorometano y se agrega N-hidroxisuccinimida (2,1 equivalentes). La solución se enfría a 0°C y se añade gota a gota una solución de dicitohexilcarbodiimida (2,1 equivalentes) en diclorometano. La solución se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 18 horas. La mezcla de reacción se filtra, se concentra y se precipita en dietil éter. El producto precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío para proporcionar mPEG-SBA-30K.

Para elaborar la rHuPH20 PEGilada, se acopló mPEG-SBA-30K al grupo o los grupos amino de rHuPH20 mediante conjugación covalente, proporcionando enlaces amida estables entre rHuPH20 y mPEG, como se muestra en el Esquema 3.

Esquema 3



Para la conjugación, el mPEG-SBA-30K se añadió en forma de polvo a rHuPH20 (a una concentración de 10 mg/mL en NaCl 130 mM/HEPES 10 mM; pH 7). La razón de PEG:rHuPH20 fue 10:1 (razón molar). Una vez que el PEG se hubo disuelto en el tampón, la solución se filtró en condiciones estériles (Corning 50 mL Filtro para parte superior de tubo, de poliestireno, con membrana de acetato de celulosa de 0,22 µm). La conjugación se llevó a cabo durante la noche, con agitación, a 4°C en una habitación fría.

Después de la conjugación, la solución se concentró, utilizando una membrana TFF de 100.000 PMC, y se intercambió el tampón frente a NaCl 130 mM/HEPES 10 mM a pH 6,8. El material resultante, que se sometió a prueba para determinar la actividad de la enzima, como se describe en el Ejemplo 4 anterior, se diluyó utilizando NaCl 130 mM/HEPES 10 mM a pH 6,8 para obtener una actividad enzimática final de 100.000 U/mL (correspondiente a aproximadamente 2,5 mg de péptido/mL). Este material de rHuPH20 PEGilada se cargó, en volúmenes de 1 mL, en un vial de vidrio Tipo-1 de 13 mm con sello de bromobutilo y se almacenó congelado (congelado durante la noche en un congelador a -20°C, a continuación se puso en un congelador a -80°C para un almacenamiento más largo).

B. Análisis de rHuPH20 PEGilada

El material rHuPH20 PEGilada se analizó mediante electroforesis en gel. Tres lotes de rHuPH20 PEGilada, elaborados como en la parte A anterior, revelaron un patrón idéntico de bandas múltiples, que representaban PEG sin reaccionar y múltiples especies de productos conjugados de mPEG-rHuPH20, que migraron a diferentes distancias. Según la comparación con la migración de un marcador de peso molecular, las bandas que representaban las especies oscilaron entre aproximadamente 90 kDa y 300 kDa, con tres bandas oscuras que migran por encima del marcador de 240 kDa. Estos datos indicaron que la rHuPH20 PEGilada, generada por la conjugación covalente de mPEG-SBA-30K, contenía una mezcla heterogénea de especies rHuPH20 PEGilada, que probablemente incluían proteínas mono-, di- y tri-PEGiladas. La falta de una banda visible a 60 kDa indica que toda la proteína había reaccionado con PEG y que no había rHuPH20 nativa detectable en la mezcla.

Ejemplo 6

Efecto del anticuerpo anti-CTLA4 y la hialuronidasa en el modelo de ratón de tumor CT26 Singénico con alto contenido de HA

Los ratones que contenían tumores singénicos CT26 con alto contenido de HA se generaron como se describe en el Ejemplo 1A2, y se trataron con la PEGPH20 descrita en el Ejemplo 5 sola o combinada con anti-CTLA4 o controles apropiados de la siguiente manera:

A. Co-Administración de PEGPH20 y Anti-CTLA4

Los ratones que contenían tumores singénicos CT26 con alto contenido de HA, con un volumen tumoral medio de $185 \pm 24 \text{ mm}^3$, se asignaron al azar a grupos de tratamiento, cada uno con 7 ratones, de manera que el volumen medio del tumor de cada grupo era sustancialmente el mismo. Los tratamientos se administraron dos veces a la semana los días 1, 4, 8 y 11, como se indica en la Tabla 11 a continuación. Se administraron PEGPH20 como se describe en el Ejemplo 5 o el tampón de Ingrediente Farmacéutico Activo (API) (histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5) por vía intravenosa (IV) y anti-CTLA4 (BioXCell Inc., Núm. de catálogo BE0164), IgG2b de ratón de control de isotipo (BioXCell Inc., Núm. de catálogo BE0086) o solución salina por vía intraperitoneal (IP), todo a los niveles de dosis indicados. Los volúmenes tumorales se midieron los días 0, 3, 7, 10 y 14. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 2.000 mm^3 , los animales fueron sacrificados por sobredosis de dióxido de carbono.

Tabla 11. Condiciones del tratamiento con PEGPH20 y anti-CTLA4

Grupo	n	Tratamiento 1	Dosis de PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
1	7	tampón API	0	Solución salina	0
2	7	tampón API	0	IgG2b de ratón	4
3	7	PEGPH20	1, 0,0375*	Solución salina	0
4	7	tampón API	0	anti-CTLA4	2
5	7	tampón API	0	anti-CTLA4	4
6	7	tampón API	0	anti-CTLA4	8
7	7	PEGPH20	1, 0,0375*	anti-CTLA4	4

* La dosis de PEGPH20 fue de 1 mg/kg el día 1 y de 0,0375 mg/kg los días 4, 8 y 11.

Los resultados se presentan en la Tabla 12. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $1 - (\text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{medición en el momento inicial})}) / (\text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{medición en el momento inicial})}) \times 100\%$. Los resultados muestran que los tumores en los animales de control, a los que se administró solución salina sola (Grupo 1) o anticuerpo de control (Grupo 2) mostraron un crecimiento progresivo a lo largo del estudio. Los tumores en animales a los que se administró PEGPH20 sola (Grupo 3) se redujeron a aproximadamente la mitad del tamaño de los tumores no tratados al finalizar el estudio. Los tumores en animales tratados con anti-CTLA4 a cualquiera de las dosis sometidas a prueba (Grupos 4-6) también se redujeron y en mayor medida que con el tratamiento con PEGPH20. La administración de 2 mg/kg (Grupo 4) y 4 mg/kg (Grupo 5) de anti-CTLA4 produjo una reducción similar en el crecimiento tumoral, con una mayor reducción en el volumen tumoral observada en el grupo al que se habían administrado 8 mg/kg de anti-CTLA4 (Grupo 6). En comparación con los animales tratados con cualquier agente solo, la administración conjunta de PEGPH20 y 4 mg/kg de anti-CTLA4 dio como resultado una mayor reducción en el volumen del tumor. Esta reducción fue mayor que la observada para cualquier otro grupo de tratamiento en los primeros momentos después de la administración, pero el día 14, a medida que el volumen del tumor comenzaba a aumentar, el tamaño del tumor fue sustancialmente el mismo que el observado en los animales a los que se administró la dosis máxima de anti-CTLA4 (8 mg/kg) (Grupo 6).

Tabla 12. Resultados

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media $\pm$ ETM					TGI
		Día 0	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	
1	control salino	186 $\pm$ 11	385 $\pm$ 17	630 $\pm$ 41	1030 $\pm$ 87	2243 $\pm$ 203	-
2	4 mg/kg IgG2b	187 $\pm$ 9	336 $\pm$ 14	612 $\pm$ 43	866 $\pm$ 94	1773 $\pm$ 231	-
3	PEGPH20	186 $\pm$ 10	231 $\pm$ 26	453 $\pm$ 45	743 $\pm$ 84	1427 $\pm$ 199	40%
4	2 mg/kg α -CTLA4	186 $\pm$ 10	364 $\pm$ 15	576 $\pm$ 44	607 $\pm$ 35	1114 $\pm$ 103	55%
5	4 mg/kg α -CTLA4	186 $\pm$ 9	367 $\pm$ 31	527 $\pm$ 37	540 $\pm$ 83	1157 $\pm$ 223	53%
6	8 mg/kg α -CTLA4	185 $\pm$ 9	338 $\pm$ 22	530 $\pm$ 53	466 $\pm$ 57	952 $\pm$ 129	63%
7	PEGPH20 + 4 mg/kg α -CTLA4	185 $\pm$ 9	216 $\pm$ 27	352 $\pm$ 39	412 $\pm$ 55	982 $\pm$ 206	61%

B. Comparación de la administración conjunta frente a la administración previa de PEGPH20

Para evaluar los efectos de la administración previa de PEGPH20 antes del tratamiento con anti-CTLA4 en comparación con la administración conjunta de PEGPH20 con anti-CTLA4, se asignaron al azar ratones con tumores CT26/HAS3, con un volumen tumoral medio de $215 \pm 32 \text{ mm}^3$, en grupos de tratamiento. Cada grupo contenía 9 ratones, de manera que el volumen tumoral medio de cada grupo fuera sustancialmente el mismo. Los tratamientos administrados para cada grupo se exponen en la Tabla 13 a continuación. Para todos los grupos de tratamiento, PEGPH20 o el tampón API se administraron por vía intravenosa (IV) dos veces por semana los días 1, 4, 8 y 11. A los ratones también se les administró solución salina, control de isotipo de IgG2b de ratón o anti-CTLA4, que se administraron por vía intraperitoneal (IP), a los niveles de dosis indicados en la Tabla 13. A los ratones de los Grupos 4 y 5 se les administró conjuntamente anticuerpo anti-CTLA4 el mismo día que el tratamiento con PEGPH20. Para el Grupo 6, a los ratones se les administró previamente PEGPH20 el día anterior al tratamiento con anti-CTLA4 (días 0,

3, 7 y 10) como se indicó, y se les administró anti-CTLA4 24 horas después (los días 1, 4, 8 y 11).

Los volúmenes tumorales se midieron en los días 0, 3, 7, 10 y 14. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 2.000 mm³, los animales fueron sacrificados por sobredosis de dióxido de carbono.

Tabla 13. Condiciones del tratamiento con PEGPH20 y anti-CTLA4

Grupo	n	Tratamiento 1	PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	IG (mg/kg)
1	9	tampón API	0	Solución salina	0
2	9	tampón API	0	IgG2b de ratón	4
3	9	PEGPH20	0,0375	Solución salina	0
4	9	tampón API	0	anti-CTLA4	4
5	9	PEGPH20	0,0375	anti-CTLA4	4
6	9	PEGPH20 *	0,0375*	anti-CTLA4	4

* La dosis de PEGPH20 para el grupo 6 se administró 24 horas antes de la dosis de anti-CTLA4

Los resultados se presentan en la Tabla 14. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $1 - (\text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{medición en el momento inicial})}) / (\text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{medición en el momento inicial})}) \times 100\%$. Al igual que en los resultados del estudio anterior, los tumores en los animales de control, la solución salina administrada sola (Grupo 1) o el anticuerpo de control (Grupo 2) mostraron un crecimiento progresivo a lo largo del estudio. Los tumores en animales a los que se administró PEGPH20 sola (Grupo 3) se redujeron a aproximadamente la mitad del tamaño de los tumores no tratados al finalizar el estudio ($p < 0,05$ para el vehículo). El tamaño promedio del tumor en los animales a los que se administró solo anti-CTLA4 (Grupo 4) también se redujo en comparación con los de los animales de control ($p < 0,05$ para el vehículo). El tamaño promedio del tumor en animales que recibieron PEGPH20 y anti-CTLA4 (Grupos 5 y 6) se redujo aún más en volumen en comparación con los tratamientos individuales. La mayor reducción en el volumen del tumor se observó en animales que recibieron PEGPH20 y anti-CTLA4, donde se administró PEGPH20 24 horas antes de la administración de anti-CTLA4 (Grupo 6) ($p = 0,0152$ para anti-CTLA4 solo). Los resultados de este estudio muestran que hay una mayor reducción en el crecimiento del tumor cuando se administran PEGPH20 y anti-CTLA4, lo que se potencia al administrar PEGPH20 antes de administrar anti-CTLA4.

Tabla 14. Resultados

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media $\pm$ ETM					TGI
		Día 0	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	
1	control salino	218 $\pm$ 12	381 $\pm$ 20	672 $\pm$ 54	1004 $\pm$ 95	1938 $\pm$ 154	-
2	Control de IgG2b	216 $\pm$ 12	377 $\pm$ 13	670 $\pm$ 42	1072 $\pm$ 72	2210 $\pm$ 203	-
3	PEGPH20	215 $\pm$ 12	253 $\pm$ 15	429 $\pm$ 44	658 $\pm$ 81	1196 $\pm$ 183	43%
4	4 mg/kg α -CTLA4	215 $\pm$ 11	367 $\pm$ 22	545 $\pm$ 36	574 $\pm$ 64	904 $\pm$ 117	60%
5	PEGPH20 + 4 mg/kg α -CTLA4	213 $\pm$ 10	258 $\pm$ 9	423 $\pm$ 23	479 $\pm$ 29	784 $\pm$ 56	67%
6	PEGPH20 * + 4 mg/kg α -CTLA4	214 $\pm$ 11	242 $\pm$ 10	351 $\pm$ 24	378 $\pm$ 49	573 $\pm$ 77	79%

* La dosis de PEGPH20 para el grupo 6 se administró 24 horas antes de la dosis de anti-CTLA4

C. Efecto dependiente de la dosis de Anti-CTLA4 Administrado previamente, después y conjuntamente con PEGPH20

Para evaluar el efecto de la administración previa, posterior o conjunta de PEGPH20 con anti-CTLA4, se asignaron al azar ratones que contenían tumores CT26/HAS3, con un volumen tumoral medio de 201 $\pm$ 27 mm³, a grupos de tratamiento, cada uno con 9 ratones, de modo que el volumen medio del tumor de cada grupo fuera sustancialmente el mismo. El régimen de dosificación se establece en la Tabla 15. Para todos los grupos de tratamiento, excepto el Grupo 9, la PEGPH20 o el control con tampón API se administraron por vía intravenosa (IV) dos veces por semana los días 1, 4, 8 y 11. A los grupos 4, 5 y 7 también se les administró anti-CTLA4 los días 1, 4, 8 y 11, recibiendo los Grupos 5 y 7 una administración conjunta de 0,0375 mg de PEGPH20 y 1 mg/kg de anti-CTLA4 (Grupo 5) o 4 mg/kg de anti-CTLA4 (Grupo 7). A los ratones de los grupos 6 y 8 se les administró previamente PEGPH20 el día antes del

tratamiento con anti-CTLA4 (días 0, 3, 7 y 10), y 24 horas después (los días 1, 4, 8 y 11) se les administraron 1 mg/kg o 4 mg/kg de anti-CTLA4, respectivamente. Para el Grupo 9, se administró PEGPH20 como una administración posterior en la que a los ratones se les administró anti-CTLA4 los días 0, 3, 7 y 10 y, 24 horas después, se les administró PEGPH20 los días 1, 4, 8 y 11.

5 Se administraron por vía intravenosa (IV) PEGPH20 o el tampón API, y se administraron por vía intraperitoneal (IP) anti-CTLA4, el control de isotipo IgG2b de ratón o la solución salina, todo a los niveles de dosis indicados. Los volúmenes tumorales se midieron los días 0, 3, 7, 10 y 14.

Tabla 15. Condiciones del tratamiento con PEGPH20 y anti-CTLA4

Grupo	n	Tratamiento	Dosis de PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
1	9	tampón API	0	Solución salina	0
2	9	tampón API	0	IgG2b de ratón	4
3	9	PEGPH20	0,0375	Solución salina	0
4	9	tampón API	0	anti-CTLA4	1
Grupo	n	Tratamiento 1	Dosis de PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
5	9	tampón API	0	anti-CTLA4	4
6	9	PEGPH20 *	0,0375*	anti-CTLA4	1
7	9	PEGPH20	0,0375	anti-CTLA4	4
8	9	PEGPH20 *	0,0375*	anti-CTLA4	4
9	9	PEGPH20 **	0,0375**	anti-CTLA4	4

* La dosis de PEGPH20 se administró 24 horas antes de la dosis de anti-CTLA4.

** La dosis de PEGPH20 se administró 24 horas después de la dosis de anti-CTLA4.

- 10 Los resultados se presentan en la Tabla 16. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $1 - (\text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{medición en el momento inicial})}) / (\text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{medición en el momento inicial})}) \times 100\%$. De manera similar a los resultados de los experimentos presentados anteriormente, los tumores en los animales de control, con solución salina administrada sola (Grupo 1) o con el anticuerpo de control (Grupo 2) mostraron un crecimiento progresivo a lo largo del estudio. Los animales a los que se administró PEGPH20 sola (Grupo 3) mostraron una inhibición del crecimiento tumoral final (TGI) del 41%, en comparación con los animales de control. La administración de anti-CTLA4 solo, a 1 mg/kg (Grupo 4) o 4 mg/kg (Grupo 5), dio como resultado una TGI de 49% y una TGI de 57%, respectivamente.
- 15
- 20 La administración conjunta de PEGPH20 y anti-CTLA4 a 1 mg/kg y 4 mg/kg proporcionó una TGI de 57% y 65%, respectivamente. De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, la administración conjunta de PEGPH20 incrementó la TGI en comparación con la administración de cualquiera de los agentes solo. Los resultados muestran que la administración previa de PEGPH20 aumenta aún más la TGI observada, mientras que la administración posterior de PEGPH20 después del tratamiento con anti-CTLA4 no aumentó más la TGI. Por ejemplo, la administración previa de PEGPH20 antes de administrar 4 mg/kg de anti-CTLA4 dio como resultado un aumento en la TGI de 65% cuando los agentes se administraron conjuntamente de 79% cuando la PEGPH20 se administró 24 h antes de la administración del anticuerpo ($p = 0,0011$ para anti-CTLA4 solo). Se observó un efecto menor cuando se administró PEGPH20 previamente 24 h antes del tratamiento con 1 mg/kg de anti-CTLA4 ($p = 0,0641$ para anti-CTLA4 solo). Cuando se administró PEGPH20 después de la administración de 4 mg/kg de anti-CTLA4, no hubo beneficio de PEGPH20 ($p = 0,35$ para anti-CTLA4 solo). Los resultados muestran que un régimen de dosificación en el que PEGPH20 se administra previamente antes de la administración del anticuerpo anti-CTLA4 da como resultado un aumento sustancial en la TGI.
- 25
- 30

Tabla 16. Resultados

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media $\pm$ ETM					
		Día 0	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	TGI
1	control salino	202 $\pm$ 10	339 $\pm$ 14	589 $\pm$ 40	1005 $\pm$ 99	1960 $\pm$ 212	-

Tabla 16. Resultados

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media $\pm$ ETM					
		Día 0	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	TGI
2	Control de IgG2b	202 $\pm$ 10	331 $\pm$ 6	556 $\pm$ 39	998 $\pm$ 78	2117 $\pm$ 114	-
3	PEGPH20	201 $\pm$ 10	243 $\pm$ 15	387 $\pm$ 36	648 $\pm$ 73	1245 $\pm$ 167	41%
4	1 mg/kg α -CTLA4	201 $\pm$ 9	335 $\pm$ 17	479 $\pm$ 41	679 $\pm$ 98	1090 $\pm$ 178	49%
5	4 mg/kg α -CTLA4	201 $\pm$ 9	328 $\pm$ 10	448 $\pm$ 22	559 $\pm$ 45	965 $\pm$ 126	57%
6	PEGPH20 * + 1 mg/kg α -CTLA4	201 $\pm$ 9	249 $\pm$ 11	351 $\pm$ 13	531 $\pm$ 46	929 $\pm$ 103	59%
7	PEGPH20 + 4 mg/kg α -CTLA4	202 $\pm$ 9	249 $\pm$ 17	353 $\pm$ 12	492 $\pm$ 24	822 $\pm$ 62	65%
8	PEGPH20 * + 4 mg/kg α -CTLA4	202 $\pm$ 9	245 $\pm$ 17	292 $\pm$ 14	377 $\pm$ 34	579 $\pm$ 56	79%
9	PEGPH20 ** + 4 mg/kg α -CTLA4	201 $\pm$ 10	265 $\pm$ 9	375 $\pm$ 25	538 $\pm$ 50	990 $\pm$ 101	55%

* La dosis de PEGPH20 se administró 24 horas antes de la dosis de anti-CTLA4.

** La dosis de PEGPH20 se administró 24 horas después de la dosis de anti-CTLA4.

D. Efecto dependiente de la dosis de PEGPH20 administrada previamente

- 5 Para evaluar si los efectos de la administración previa de PEGPH20 eran dependientes de la dosis, los ratones que contenían tumores CT26/HAS3, con un volumen tumoral medio de 211 $\pm$ 33 mm³, fueron asignados al azar a grupos de tratamiento. Cada grupo de tratamiento contenía 10 ratones, de manera que el volumen medio del tumor de cada grupo fuera sustancialmente el mismo. El régimen de dosificación para los grupos tratados se expone en la Tabla 17. Para todos los grupos de tratamiento, 0 (control de tampón API) o 0,0375 mg/kg o 1 mg/kg de PEGPH20 se administraron por vía intravenosa (IV) dos veces por semana los días 1, 4, 8 y 11. El grupo 4 también recibió 4 mg/kg de anti-CTLA4 en los días 1, 4, 8 y 11. Para los grupos 5 y 6, a los ratones se les administró previamente PEGPH20 en los días 0, 3, 7 y 10 a 1 mg/kg o 0,0375 mg/kg, respectivamente, como se indica en la Tabla 17 y, 24 horas después, se administró anti-CTLA4 los días 1, 4, 8 y 11. Los tratamientos con anti-CTLA4 o solución salina se administraron por vía intraperitoneal (IP). Los volúmenes tumorales se midieron los días 0, 3, 7, 10 y 14.

Tabla 17. Condiciones del tratamiento con PEGPH20 y anti-CTLA4

Grupo	N	Tratamiento 1	Dosis de PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
1	10	tampón API	0	Solución salina	0
2	10	PEGPH20	0,0375	Solución salina	0
3	10	PEGPH20	1	Solución salina	0
4	10	tampón API	0	anti-CTLA4	4
5	10	PEGPH20 *	1*	anti-CTLA4	4
6	10	PEGPH20 *	0,0375*	anti-CTLA4	4

* La dosis de PEGPH20 para los grupos 5 y 6 se administró 24 horas antes de la dosis de anti-CTLA4.

- 15 Los resultados se presentan en la Tabla 18. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $1 - (\text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{medición en el momento inicial})}) / (\text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{medición en el momento inicial})}) \times 100\%$. De manera similar a los resultados descritos anteriormente, los tumores en los animales de control a los que se había administrado solución salina sola (Grupo 1) mostraron un crecimiento progresivo a lo largo del estudio. Los animales a los que se había administrado PEGPH20 sola, a 0,0375 mg/kg (Grupo 2) o 1 mg/kg (Grupo 3), mostraron volúmenes de tumor promedio ligeramente reducidos en comparación con los animales de control. Es posible que la eficacia reducida de PEGPH20 observada en este experimento se deba a la presencia de menos HA tumoral en los animales utilizados en estos experimentos. La administración de anti-CTLA4 (4 mg/kg) solo (Grupo 4), dio como resultado una reducción ligeramente mayor de 50% en el volumen del tumor en comparación con el control de vehículo. Los animales que recibieron anti-CTLA4 combinado con PEGPH20 administrada previamente a 0,0375 o 1 mg/kg, mostraron un volumen tumoral reducido adicional en comparación con los animales tratados solo con anti-CTLA4, con poca diferencia entre las diferentes dosis de PEGPH20.

Tabla 18. Resultados

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media $\pm$ ETM					TGI
		Día 0	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	
1	control salino	212 $\pm$ 12	359 $\pm$ 18	610 $\pm$ 26	946 $\pm$ 76	1908 $\pm$ 196	-
2	37,5 μ g/kg PEGPH20	211 $\pm$ 11	262 $\pm$ 10	527 $\pm$ 19	904 $\pm$ 48	1820 $\pm$ 106	5%
3	1 mg/kg PEGPH20	212 $\pm$ 11	238 $\pm$ 10	497 $\pm$ 27	878 $\pm$ 74	1735 $\pm$ 137	10%
4	4 mg/kg α -CTLA4	212 $\pm$ 11	358 $\pm$ 17	509 $\pm$ 35	594 $\pm$ 66	972 $\pm$ 117	55%
5	1 mg/kg PEGPH20 * + 4 mg/kg α -CTLA4	210 $\pm$ 10	230 $\pm$ 20	315 $\pm$ 21	518 $\pm$ 43	816 $\pm$ 87	64%
6	37,5 μ g/kg PEGPH20 * + 4 mg/kg α -CTLA4	211 $\pm$ 10	258 $\pm$ 13	326 $\pm$ 23	460 $\pm$ 41	758 $\pm$ 82	68%

Ejemplo 7**Efecto del anticuerpo anti-PD-L1 y la hialuronidasa administrada previamente en el modelo de ratón con tumor MH194 + PSC4 singénico con alto contenido de HA**

Se asignaron al azar ratones que contenían tumores singénicos MH194+PSC4 con alto contenido de HA generados como se describe en el Ejemplo 1, con un volumen tumoral medio de 168 ± 24 mm³, a grupos de tratamiento, cada uno con 8 ratones, de modo que el volumen medio tumoral de cada grupo fuera sustancialmente el mismo. Se administraron PEGPH20 como se describe en el Ejemplo 5 o el tampón de Ingrediente Farmacéutico Activo (API) (histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5) por vía intravenosa (IV) los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17, y se administraron anti PD-L1 (BioXCell Inc, clon 10F.9G2, Núm. de catálogo BE0101) o control de isotipo IgG2b de rata (BioXCell Inc, Núm. de catálogo BE0090) por vía intraperitoneal (IP) los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18, todos a los niveles de dosis indicados en la Tabla 19. Los volúmenes de tumores se midieron los días 0, 3, 7, 10, 14, 17 y 21.

Tabla 19. Condiciones del tratamiento con PEGPH20 y anti-PD-L1

Grupo	n	Tratamiento 1	Dosis de PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis de IG (mg/kg)
1	8	tampón API	0*	IgG2b de rata	4
2	8	PEGPH20	1*	IgG2b de rata	4
3	8	tampón API	0*	anti-PD-L1	1
4	8	PEGPH20	1*	anti-PD-L1	1
5	8	tampón API	0*	anti-PD-L1	2
6	8	PEGPH20	1*	anti-PD-L1	2
7	8	tampón API	0*	anti-PD-L1	4
8	8	PEGPH20	1*	anti-PD-L1	4

* La PEGPH20 o el tampón API se administraron 24 horas antes de la dosis de anti-PD-L1.

Los resultados se presentan en la Tabla 20. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $1 - \frac{(\text{volumen del tumor, artículo de prueba})_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{medición en el momento inicial})}}{(\text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{medición en el momento inicial})}} \times 100\%$. Los resultados mostraron que los tumores con alto contenido de HA MH194+PSC4 en los animales de control, con administración de tampón API y control de isotipo solo (Grupo 1) mostraron un crecimiento progresivo a lo largo del estudio. El desarrollo de tumores en animales a los que se administró PEGPH20 sola (Grupo 2) se redujo significativamente ($p = 0,004$ para el Grupo 1) a aproximadamente 2/3 del tamaño de los tumores tratados con vehículo/isotipo al finalizar el estudio. El crecimiento de tumores en animales tratados con anti-PD-L1 a cualquiera de las dosis sometidas a prueba (Grupos 3, 5 y 7) también se redujo significativamente ($p = 0,0015$, $0,0008$ y $<0,0001$, respectivamente, para anti-PD-L1 a 1, 2 y 4 mg/kg). La administración de PEGPH20 a 1 mg/kg 24 h antes de 2 mg/kg de anti-PD-L1 (Grupo 6) produjo una reducción significativamente mayor en el volumen del tumor en comparación con 2 mg/kg de anti-PD-L1 solo ($p = 0,005$) o 1 mg/kg de PEGPH20 solo ($p = 0,007$). Los resultados muestran que el tratamiento combinado con PEGPH20 y anti-PD-L1 reduce el crecimiento del tumor mejor que PEGPH20 o anti-PD-L1 individualmente.

Tabla 20. Resultados

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media $\pm$ ETM			
		Día 0	Día 3	Día 7	Día 10
1	Tampón API* + 4 mg/kg IgG2b de rata	172 $\pm$ 8	277 $\pm$ 17	469 $\pm$ 22	581 $\pm$ 38
2	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg IgG2b de rata	171 $\pm$ 8	254 $\pm$ 14	318 $\pm$ 29	479 $\pm$ 42
3	Tampón API* + 1 mg/kg α -PD-L1	170 $\pm$ 9	315 $\pm$ 17	506 $\pm$ 33	578 $\pm$ 32
4	1 mg/kg PEGPH20* + 1 mg/kg α -PD-L1	164 $\pm$ 6	223 $\pm$ 13	300 $\pm$ 31	452 $\pm$ 46
5	Tampón API* + 2 mg/kg α -PD-L1	171 $\pm$ 8	294 $\pm$ 16	427 $\pm$ 44	553 $\pm$ 47
6	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α -PD-L1	164 $\pm$ 10	237 $\pm$ 7	270 $\pm$ 26	372 $\pm$ 23
7	Tampón API* + 4 mg/kg α -PD-L1	169 $\pm$ 12	294 $\pm$ 19	321 $\pm$ 23	309 $\pm$ 32
8	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg α -PD-L1	162 $\pm$ 9	249 $\pm$ 12	247 $\pm$ 22	303 $\pm$ 28

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media $\pm$ ETM			TGI
		Día 14	Día 17	Día 21	
1	Tampón API* + 4 mg/kg IgG2b rata	852 $\pm$ 70	1.182 $\pm$ 86	2.145 $\pm$ 140	-
2	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg IgG2b rata	647 $\pm$ 64	937 $\pm$ 86	1.468 $\pm$ 112	34%
3	Tampón API* + 1 mg/kg α -PD-L1	739 $\pm$ 56	1.016 $\pm$ 100	1.626 $\pm$ 109	26%
4	1 mg/kg PEGPH20* + 1 mg/kg α -PD-L1	578 $\pm$ 65	774 $\pm$ 101	1.300 $\pm$ 211	43%
5	Tampón API* + 2 mg/kg α -PD-L1	613 $\pm$ 72	909 $\pm$ 136	1.761 $\pm$ 226	19%
6	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α -PD-L1	398 $\pm$ 46	578 $\pm$ 72	1.029 $\pm$ 139	57%
7	Tampón API* + 4 mg/kg α -PD-L1	332 $\pm$ 60	384 $\pm$ 78	667 $\pm$ 158	75%
8	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg α -PD-L1	343 $\pm$ 40	421 $\pm$ 65	664 $\pm$ 88	75%

* El tampón API o PEGPH20 se administraron 24 horas antes de la dosis de anti-PD-L1 o control de isotipo

Ejemplo 8**5 Efecto del anticuerpo anti-PD-L1 y la dosis más baja de hialuronidasa administrada previamente en el modelo de ratón con tumor MH194+PSC4 singénico con alto contenido de HA**

Se asignaron al azar ratones que contenían tumores singénicos MH194+PS194 con alto contenido de HA generados como se ha descrito en el Ejemplo 1, con un volumen tumoral medio de 131 ± 20 mm³, a grupos de tratamiento, cada uno con 8 ratones, de modo que el volumen tumoral medio de cada grupo fuera sustancialmente el mismo. La PEGPH20 como se describe en el Ejemplo 5 o el tampón de Ingrediente Farmacéutico Activo (API) (histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5) se administraron por vía intravenosa (IV) los días 0, 3, 6, 8, 12, 15 y 19, y anti-PD-L1 (BioXCell Inc, clon 10F.9G2, Núm. de catálogo BE0101) o el control de isotipo IgG2b de rata (BioXCell Inc, Núm. de catálogo BE0090) se administraron por vía intraperitoneal (IP) los días 1, 4, 7, 9, 13, 16 y 20, todos a los niveles de dosis indicados en la Tabla 21. Los volúmenes tumorales se midieron los días 0, 2, 6, 9, 13, 16 y 20.

Tabla 21. Condiciones de tratamiento con PEGPH20 y anti-PD-L1

Grupo	N	Tratamiento 1	Dosis de PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
1	8	tampón API	0*	IgG2b rata	2
2	8	tampón API	0*	anti-PD-L1	2
3	8	PEGPH20	1*	IgG2b rata	2
4	8	PEGPH20	1*	anti-PD-L1	2
5	8	PEGPH20	0,0375*	IgG2b rata	2

Tabla 21. Condiciones de tratamiento con PEGPH20 y anti-PD-L1

Grupo	N	Tratamiento 1	Dosis de PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
6	8	PEGPH20	0,0375*	anti-PD-L1	2

* La PEGPH20 o el tampón API se administraron 24 horas antes de la dosis de IgG2b o anti-PD-L1.

Una dosis equivalente humana de PEGPH20 es de 37,5 µg/kg, cuando la dosis humana es de 3 µg/kg. Los resultados se presentan en la Tabla 22. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $1 - (\text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{medición en el momento inicial})}) / (\text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{medición en el momento inicial})}) \times 100\%$. Los resultados mostraron que los tumores MH194+PSC4 con alto contenido de HA en los animales de control, a los que se habían administrado el tampón API administrado y el control de isotipo solo (Grupo 1) mostraban un crecimiento progresivo a lo largo del estudio. El crecimiento de los tumores en animales a los que se había administrado anti-PD-L1 solo (Grupo 2) se redujo significativamente ($p = 0,049$ al Grupo 1) a aproximadamente 2/3 del tamaño de los tumores tratados con vehículo/isotipo al finalizar el estudio. La administración de PEGPH20 a 37,5 µg/kg 24 h antes de los 2 mg/kg de anti-PD-L1 (Grupo 6) produjo una reducción significativamente mayor en el volumen del tumor en comparación con 2 mg/kg de anti-PD-L1 solo ($p < 0,0001$) o 37,5 µg/kg de PEGPH20 sola ($p < 0,0001$), y también dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral significativamente mejorada cuando se comparó con PEGPH20 a 1 mg/kg 24 h antes de 2 mg/kg de anti-PD-L1 (Grupo 4) ($p < 0,0001$).

Los resultados muestran que el tratamiento combinado con 37,5 µg/kg de PEGPH20 y anti-PD-L1 reduce el crecimiento del tumor mejor que la combinación de 1 mg/kg de PEGPH20 y anti-PD-L1. Esta dosificación es la dosificación de roedor que corresponde a las dosis utilizadas en seres humanos. Por lo tanto, la dosificación de la enzima de degradación de hialuronano se puede titular o seleccionar.

Tabla 22. Resultados

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media ± ETM			
		Día 0	Día 2	Día 6	Día 9
1	Tampón API* + 2 mg/kg IgG2b de rata	129 ± 8	272 ± 13	399 ± 20	523 ± 35
2	Tampón API* + 2 mg/kg α-PD-L1	1134 ± 8	240 ± 27	323 ± 33	317 ± 50
3	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg IgG2b de rata	130 ± 8	262 ± 30	330 ± 30	428 ± 47
4	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-L1	131 ± 8	178 ± 10	208 ± 21	252 ± 54
5	37,5 µg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg IgG2b de rata	129 ± 5	192 ± 15	331 ± 40	441 ± 42
6	37,5 µg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-L1	134 ± 7	233 ± 24	225 ± 35	146 ± 28

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media ± ETM			TGI
		Día 14	Día 17	Día 21	
1	Tampón API* + 2 mg/kg IgG2b rata	777 ± 75	1.064 ± 113	1.362 ± 135	-
2	Tampón API* + 2 mg/kg α-PD-L1	606 ± 90	834 ± 154	982 ± 217	31%
3	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg IgG2b de rata	717 ± 83	943 ± 128	1.420 ± 227	-5%
4	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-L1	388 ± 77	582 ± 91	701 ± 167	454%
5	37,5 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg IgG2b de rata	715 ± 64	1.013 ± 54	1.493 ± 91	-11%
6	37,5 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-L1	146 ± 38	259 ± 59	270 ± 76	89%

* Tampón API o PEGPH20 se administraron 24 horas antes de la dosis de anti-PD-L1 o control de isotipo

Ejemplo 9

Efecto del anticuerpo anti-PD-1 y la hialuronidasa administrada previamente en el modelo de ratón con tumor MH194+PSC4 singénico con alto contenido de HA

Los ratones que contenían tumores singénicos MH194+PSC4 con alto contenido de HA se generaron como se ha

descrito en el Ejemplo 1, y se trataron con la PEGPH20 descrita en el Ejemplo 5 sola y combinada con anti-PD-1 o controles apropiados de la siguiente manera:

A. Administración previa de PEGPH20 y dosis altas de anti-PD-1

Se asignaron al azar ratones que contenían tumores MH194+PSC4 singénicos con alto contenido de HA con un volumen tumoral medio de $128 \pm 24 \text{ mm}^3$, a grupos de tratamiento, cada uno con 8 ratones, de modo que el volumen tumoral medio de cada grupo fuera sustancialmente el mismo. La PEGPH20 descrita en el Ejemplo 5 o el tampón de Ingrediente Farmacéutico Activo (API) (histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5) se administraron por vía intravenosa (IV) los días 0, 3, 7, 10, 14, 17 y 21, y anti-PD-1 (BioXCell Inc, clon RMP1-14, Núm. de catálogo BE0146) o la solución salina se administraron por vía intraperitoneal (IP) los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18, todos a los niveles de dosis indicados en Tabla 23. Los volúmenes tumorales se midieron los días 0, 3, 7, 10, 14, 17 y 21.

Tabla 23. Condiciones de tratamiento con PEGPH20 y anti-PD-1

Grupo	n	Tratamiento 1	Dosis de PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
1	8	tampón API	0*	Solución salina	0
2	8	PEGPH20	1*	Solución salina	0
3	8	tampón API	0*	anti-PD-1	4
4	8	PEGPH20	1*	anti-PD-1	4

* La PEGPH20 o el tampón API se administraron 24 horas antes de la dosis de anti-PD-1.

Los resultados se presentan en la Tabla 24. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $1 - (\text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{medición en el momento inicial})}) / (\text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{medición en el momento inicial})}) \times 100\%$. Los resultados mostraron que el crecimiento de tumores en animales a los que se administró PEGPH20 sola (Grupo 2) se redujo significativamente ($p < 0,0001$ para el Grupo 1) a aproximadamente la mitad del tamaño de los tumores tratados con vehículo (Grupo 1) al finalizar el estudio. El crecimiento de tumores en animales tratados con anti-PD-1 a 4 mg/kg (Grupo 3) se inhibió casi completamente ($p < 0,0001$) y la administración de PEGPH20 a 1 mg/kg 24 h antes de 4 mg/kg de anti-PD-1 (Grupo 4) no produjo ninguna reducción adicional en el volumen del tumor en comparación con 4 mg/kg de anti-PD-1 solo ($p = 0,63$).

Tabla 24. Resultados

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm^3), Media $\pm$ ETM			
		Día 0	Día 3	Día 7	Día 10
1	Tampón API* + solución salina	129 $\pm$ 11	242 $\pm$ 13	353 $\pm$ 23	435 $\pm$ 33
2	1 mg/kg PEGPH20* + solución salina	124 $\pm$ 7	179 $\pm$ 17	275 $\pm$ 16	320 $\pm$ 25
3	Tampón API* + 4 mg/kg α -PD-1	130 $\pm$ 8	198 $\pm$ 17	262 $\pm$ 32	223 $\pm$ 22
4	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg α -PD-1	128 $\pm$ 9	153 $\pm$ 14	188 $\pm$ 23	205 $\pm$ 19

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm^3), Media $\pm$ ETM			TGI
		Día 14	Día 17	Día 21	
1	Tampón API* + solución salina	688 $\pm$ 65	1.068 $\pm$ 116	1.930 $\pm$ 215	-
2	1 mg/kg PEGPH20* + solución salina	493 $\pm$ 40	784 $\pm$ 58	1.168 $\pm$ 102	42%
3	Tampón API* + 4 mg/kg α -PD-1	181 $\pm$ 27	211 $\pm$ 52	222 $\pm$ 75	95%
4	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg α -PD-1	233 $\pm$ 34	272 $\pm$ 90	422 $\pm$ 142	84%

* El tampón API o la PEGPH20 se administraron 24 horas antes de la dosis de anti-PD-1 o solución salina.

B. Administración previa de PEGPH20 y dosis más baja de anti-PD-1, el tratamiento comenzó a diferentes tamaños de tumores

Se asignaron al azar ratones que contenían tumores singénicos MH194+PSC4 con alto contenido de HA con un

- 5 volumen tumoral medio de $138 \pm 24 \text{ mm}^3$, a grupos de tratamiento, cada uno con 8 ratones, de modo que el volumen medio tumoral de cada grupo fuera sustancialmente el mismo. La PEGPH20 descrita en el Ejemplo 5 o el tampón de Ingrediente Farmacéutico Activo (API) (histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5) se administraron por vía intravenosa (IV) los días 0 (grupos 1-4 solamente), 3 (grupos 1-7 solamente), 7, 10, 14, 17 y 21, y el anti-PD-1 (BioXCell Inc, clon RMP1-14, Núm. de Catálogo BE0146) o el control de isotipo IgG2a de rata (BioXCell Inc, Núm. de catálogo BE0089) se administraron por vía intraperitoneal (IP) los días 1 (grupos 1-4 solamente), 4 (grupos 1-7 solamente), 8, 11, 15 y 18, todos a los niveles de dosis indicados en la Tabla 23. Los volúmenes de los tumores se midieron los días 0, 3, 7, 10, 14, 17 y 21, excepto lo indicado para los grupos 8-10 en la Tabla 25.

Tabla 25. Condiciones del tratamiento con PEGPH20 y anti-PD-1

Grupo	n	Tratamiento 1	Dosis PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
1	8	Tampón API	0*	IgG2a rata	2
2	8	PEGPH20	1*	IgG2a rata	2
3	8	Tampón API	0*	anti-PD-1	2
4	8	PEGPH20	1*	anti-PD-1	2
5**	8	PEGPH20	1*	IgG2a rata	2
6**	8	Tampón API	0*	anti-PD-1	2
7**	8	PEGPH20	1*	anti-PD-1	2
8***	8	PEGPH20	1*	IgG2a rata	2
9***	8	Tampón API	0*	anti-PD-1	2
10***	8	PEGPH20	1*	anti-PD-1	2

* La PEGPH20 o el tampón API se administraron 24 horas antes de la dosis de anti-PD-1.

** El tratamiento se retrasó hasta que el tamaño promedio del tumor fue de aproximadamente 300 mm^3 (día 3 del estudio).

*** El tratamiento se retrasó hasta que el tamaño promedio del tumor fue de aproximadamente 400 mm^3 (día 7 del estudio).

- 10 Los resultados se presentan en la Tabla 26. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $1 - (\text{volumen del tumor, artículo de prueba})_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{medición en el momento inicial})} / (\text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{medición en el momento inicial})}) \times 100\%$. Cuando el tratamiento comenzaba el día 0 del estudio, los resultados mostraban que el crecimiento de los tumores en animales a los que se había administrado PEGPH20 sola (Grupo 2) o anti-PD-1 solo (Grupo 3) se reducía
- 15 significativamente ($p = 0,0021$ y $<0,0001$, respectivamente, para el Grupo 1) hasta aproximadamente la mitad del tamaño de los tumores tratados con vehículo (Grupo 1) al finalizar el estudio. La administración de PEGPH20 a 1 mg/kg 24 h antes de 2 mg/kg de anti-PD-1 (Grupo 4) no produjo ninguna reducción adicional en el volumen del tumor en comparación con 2 mg/kg de anti-PD-1 solo ($p = 0,07$). Cuando el tratamiento se iniciaba el día 3 del estudio (Grupos 5-7), el anti-PD-1 todavía tenía un efecto inhibitor significativo sobre el crecimiento del tumor ($p < 0,0001$), y nuevamente no se observaba ningún efecto adicional en presencia de PEGPH20. Finalmente, cuando se
- 20 iniciaba el tratamiento el día 7 del estudio (Grupos 8-10), el efecto de anti-PD-1 solo o PEGPH20 sola ya no era significativo ($p = 0,70$), y el efecto de la combinación no era significativamente diferente del de la PEGPH20 sola ($p = 0,45$). Por lo tanto, PEGPH20 no mejoró la eficacia de anti-PD-1 en este modelo de tumor.

Tabla 26. Resultados

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm^3), Media $\pm$ ETM			
		Día 0	Día 3	Día 7	Día 10
1	Tampón API* + 2 mg/kg IgG2a de rata	137 ± 7	308 ± 19	418 ± 36	559 ± 56
2	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg IgG2a de rata	138 ± 4	225 ± 14	336 ± 24	447 ± 29
3	Tampón API* + 2 mg/kg α -PD-1	140 ± 10	265 ± 26	384 ± 56	437 ± 78
4	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α -PD-1	142 ± 12	200 ± 18	237 ± 30	218 ± 15
5**	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg IgG2a de rata	135 ± 8	245 ± 24	332 ± 20	389 ± 31

6**	Tampón API * + 2 mg/kg α -PD-1	137 $\pm$ 9	278 $\pm$ 14	335 $\pm$ 20	310 $\pm$ 20
7**	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α -PD-1	136 $\pm$ 1	291 $\pm$ 16	280 $\pm$ 20	379 $\pm$ 34
8***	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg IgG2a de rata	138 $\pm$ 10	No medido	418 $\pm$ 44	379 $\pm$ 34
9***	Tampón API * + 2 mg/kg α -PD-1	138 $\pm$ 9		429 $\pm$ 27	570 $\pm$ 52
10***	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α -PD-1	136 $\pm$ 8		382 $\pm$ 47	371 $\pm$ 37

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media $\pm$ ETM			TGI
		Día 14	Día 17	Día 21	
1	Tampón API* + 2 mg/kg IgG2a de rata	868 $\pm$ 78	1.209 $\pm$ 147	2.196 $\pm$ 215	-
2	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg IgG2a de rata	538 $\pm$ 45	716 $\pm$ 44	1.317 $\pm$ 75	43%
3	Tampón API * + 2 mg/kg α -PD-1	471 $\pm$ 77	554 $\pm$ 97	1.063 $\pm$ 249	55%
4	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α -PD-1	309 $\pm$ 33	407 $\pm$ 59	775 $\pm$ 133	69%
5**	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg IgG2a de rata	617 $\pm$ 59	819 $\pm$ 74	1.589 $\pm$ 158	29%
6**	Tampón API * + 2 mg/kg α -PD-1	345 $\pm$ 40	442 $\pm$ 78	797 $\pm$ 148	68%
7**	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α -PD-1	458 $\pm$ 37	574 $\pm$ 64	1.033 $\pm$ 129	57%
8***	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg IgG2a de rata	648 $\pm$ 63	867 $\pm$ 164	1.349 $\pm$ 224	41%
9***	Tampón API * + 2 mg/kg α -PD-1	817 $\pm$ 74	1.150 $\pm$ 132	1.875 $\pm$ 221	16%
10***	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α -PD-1	566 $\pm$ 61	772 $\pm$ 108	1.132 $\pm$ 158	52%
* El tampón API o la PEGPH20 se administraron 24 horas antes de la dosis de anti-PD-1 o el control de isotipo.					
** El tratamiento se retrasó hasta que el tamaño promedio del tumor fue de aproximadamente 300 mm ³ (día 3 del estudio).					
*** El tratamiento se retrasó hasta que el tamaño promedio del tumor fue de aproximadamente 400 mm ³ (día 7 del estudio).					

Ejemplo 10

5 Efecto del anticuerpo anti-PD-1 y de la dexametasona administrada previamente en el modelo de ratón con tumor MH194+PSC4 singénico

Se asignaron al azar ratones que contenían tumores singénicos MH194+PSC4 parentales generados como se describe en el Ejemplo 1C, con un volumen tumoral medio de 131 $\pm$ 26 mm³, a grupos de tratamiento, cada uno con 6 ratones, de modo que el volumen tumoral medio de cada grupo fuera sustancialmente el mismo. La dexametasona o la solución salina (cloruro de sodio al 0,9% para inyectables) se administraron por vía intraperitoneal (IP) los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17, y el anti-PD-1 (BioXCell Inc, clon RMP1-14, Núm. de catálogo BE0146) o la solución salina se administraron por vía intraperitoneal (IP) los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18, todos a los niveles de dosis indicados en la Tabla 27. Los volúmenes tumorales se midieron los días 0, 3, 7, 10, 14, 17 y 21. La dosis media de dexametasona (3 mg/kg) se seleccionó para que se aproximara a la dosis humana equivalente para los ensayos clínicos en los que se administra PEGPH20 con dexametasona para aliviar las molestias musculoesqueléticas.

Tabla 27. Condiciones de tratamiento con dexametasona y anti-PD-1

Grupo	n	Tratamiento 1	Dosis de dexametasona (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
1	6	Solución salina	0*	Solución salina	0
2	6	Solución salina	0*	anti-PD-1	4
3	6	Dexametasona	1*	Solución salina	0
4	6	Dexametasona	3*	Solución salina	0
5	6	Dexametasona	5*	Solución salina	0
6	6	Dexametasona	1*	anti-PD-1	4

Tabla 27. Condiciones de tratamiento con dexametasona y anti-PD-1

Grupo	n	Tratamiento 1	Dosis de dexametasona (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
7	6	Dexametasona	3*	anti-PD-1	4
8	6	Dexametasona	5*	anti-PD-1	4

* El control con dexametasona o solución salina se administró 24 horas antes de la dosis de anti-PD-1.

Los resultados se presentan en la Tabla 28. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $1 - (\text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, artículo de prueba}_{(\text{medición en el momento inicial})}) / (\text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{último día})} - \text{volumen del tumor, vehículo}_{(\text{medición en el momento inicial})}) \times 100\%$. Los resultados mostraron que el crecimiento de tumores en animales tratados con anti-PD-1 a 4 mg/kg (Grupo 2) fue inhibido en aproximadamente 2/3 ($p < 0,0001$), mientras que la dexametasona inhibió significativamente el crecimiento del tumor solo en la dosis más alta sometida a prueba, 5 mg/kg ($p = 0,0009$). La administración de dexametasona a dosis de 1 a 5 mg/kg 24 h antes de los 4 mg/kg de anti-PD-1 (Grupo 4) no alteró el efecto de anti-PD-1 ($p = 0,12, 0,65, \text{ y } 0,70$, respectivamente, para la dexametasona a 1, 3 y 5 mg/kg más anti-PD-1 vs. anti-PD-1 solo).

Tabla 28. Resultados

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media $\pm$ ETM			
		Día 0	Día 3	Día 7	Día 10
1	Solución salina* + Solución salina	135 $\pm$ 17	307 $\pm$ 36	449 $\pm$ 63	596 $\pm$ 72
2	Solución salina* + 4 mg/kg α -PD-1	132 $\pm$ 10	340 $\pm$ 41	361 $\pm$ 56	316 $\pm$ 54
3	1 mg/kg Dex* + Solución salina	133 $\pm$ 8	240 $\pm$ 19	374 $\pm$ 39	581 $\pm$ 50
4	3 mg/kg Dex* + Solución salina	133 $\pm$ 9	253 $\pm$ 17	436 $\pm$ 23	553 $\pm$ 63
5	5 mg/kg Dex* + Solución salina	125 $\pm$ 10	251 $\pm$ 22	390 $\pm$ 46	462 $\pm$ 46
6	1 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α -PD-1	126 $\pm$ 10	253 $\pm$ 38	283 $\pm$ 51	203 $\pm$ 45
7	3 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α -PD-1	134 $\pm$ 10	218 $\pm$ 26	342 $\pm$ 59	350 $\pm$ 86
8	5 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α -PD-1	135 $\pm$ 13	277 $\pm$ 36	345 $\pm$ 41	320 $\pm$ 75

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³), Media $\pm$ ETM			TGI
		Día 14	Día 17	Día 21	
1	Solución salina* + solución salina	981 $\pm$ 169	1.431 $\pm$ 135	2.316 $\pm$ 247	-
2	Solución salina* + 4 mg/kg α -PD-1	384 $\pm$ 80	574 $\pm$ 159	840 $\pm$ 270	68%
3	1 mg/kg Dex* + Solución salina	904 $\pm$ 81	1.354 $\pm$ 147	1.899 $\pm$ 155	19%
4	3 mg/kg Dex* + Solución salina	759 $\pm$ 81	1.346 $\pm$ 109	1.867 $\pm$ 130	21%
5	5 mg/kg Dex* + Solución salina	729 $\pm$ 77	1.202 $\pm$ 118	1.630 $\pm$ 126	31%
6	1 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α -PD-1	231 $\pm$ 59	271 $\pm$ 127	319 $\pm$ 155	91%
7	3 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α -PD-1	348 $\pm$ 90	468 $\pm$ 196	642 $\pm$ 277	77%
8	5 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α -PD-1	364 $\pm$ 107	493 $\pm$ 197	659 $\pm$ 247	76%

* La Dexametasona (Dex) o la solución salina se administraron 24 horas antes de la dosis de anti-PD-1 o solución salina.

Ejemplo 11

Generación de anticuerpos anti-CTLA4, PD-1 y PD-L1 humanos marcados con Alexa Fluor 488 (AF488)

Se utilizó el kit de marcaje de proteínas Alexa Fluor 488 (AF488) (Life Technologies, Núm. de catálogo A-10235) para marcar el anticuerpo anti-PD-L1 humano (G&P Biosciences, Núm. de catálogo MAB0199), el anticuerpo anti-

PD-1 humano (G&P Biosciences, Núm. de catálogo MAB1732), y el anticuerpo anti-CTLA4 humano (G&P Biosciences, Núm. de catálogo MAB1718).

El marcaje se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó una solución 1 M de bicarbonato de sodio y se añadieron 100 µL de la solución preparada a 1 mL de 1 mg/mL de anticuerpo (total de 1 mg de anticuerpo). Esta mezcla se añadió a un tubo de colorante reactivo AF488, suministrado por el fabricante. La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con balanceo suave.

Los anticuerpos anti-humanos marcados con AF488, denominados AF488-anti-PD-L1, AF488-anti-PD-1, y AF488-anti-CTLA4, y como grupo denominado anticuerpo AF488, se separaron utilizando columnas Bio-Rad micro Bio - Spin 6 (Bio-Rad, Núm. de catálogo 732-6621). La concentración total de proteínas se determinó mediante el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Pierce, Núm. de catálogo 23227).

Ejemplo 12

Efecto de la hialuronidasa sobre anti-PD-L1 humano, anti-CTLA4 humano y anti-PD-1 humano: accesibilidad al modelo de ratón con tumor de xenoinjerto con alto contenido de HA

Se generaron ratones que portaban tumores de xenoinjerto SKOV3/HAS2 con alto contenido de HA como se describe en el Ejemplo 2, y se trataron con la PEGPH20 descrita en el Ejemplo 5 sola y combinada con AF488-anti-PD-L1, -PD-1 o -CTLA4 (descritos en el Ejemplo 9) como sigue:

Se asignaron al azar ratones que contenían tumores de xenoinjerto con alto contenido de HA, con un volumen tumoral medio de 500 mm³, a grupos de tratamiento, cada uno con 4 ratones, de manera que el volumen medio tumoral de cada grupo fuera sustancialmente el mismo. Los tratamientos se administraron una vez como se indica en la Tabla 29 a continuación. El anticuerpo AF488 como se describe en el Ejemplo 7 o el tampón de Ingrediente Farmacéutico Activo (API) (histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5) o la PEGPH20 (descrita en el Ejemplo 5) y el anticuerpo AF488 se administraron por vía intravenosa (IV), todo a los niveles de dosis indicados. Los tumores se recogieron 48 h después del tratamiento y se tomaron imágenes con un sistema de obtención de imágenes Bio-Rad Chemidoc MP (Bio-Rad).

Tabla 29. Condiciones del tratamiento con PEGPH20 y anti-PD-L1 humano

Grupo	n	Tratamiento 1	Dosis de PEGPH20 (mg/kg)	Tratamiento 2	Dosis IG (mg/kg)
1	4	tampón API	0	Solución salina	0
2	4	tampón API	0	AF488-anti-PD-L1	1
3	4	PEGPH20	0,0375	AF488-anti-PD-L1	1
4	5	tampón API	0	AF488-anti-PD-1	1
5	5	PEGPH20	0,0375	AF488-anti-PD-1	1
6	5	tampón API	0	AF488-anti-CTLA4	1
7	5	PEGPH20	0,0375	AF488-anti-CTLA4	1

Los resultados se presentan en la Tabla 30 (recuento de píxeles positivo) y en la Tabla 31 (intensidad de fluorescencia media). Los recuentos de píxeles y las medias de la intensidad de fluorescencia se obtuvieron con el soporte lógico Image Pro (MediaCybernetics Image Pro Analyzer 7.0), y se restó el fondo promedio de los tumores en animales a los que no se había inyectado el anticuerpo AF488. Los resultados mostraron que la fluorescencia era detectable en los tumores en los animales que recibieron el anticuerpo AF488 solo (Grupos 2, 4 y 6). La intensidad de la fluorescencia aumentó significativamente en los tumores en animales tratados con la combinación de PEGPH20 y AF488-anti-PD-L1 (Grupo 3). Por otro lado, no se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia en animales tratados con PEGPH20 y AF488-anti-PD-1 o AF488-anti-CTLA4, cuando se compararon con los animales tratados solo con AF488-PD-1 o -CTLA4, en ausencia de PEGPH20 (Grupos 5 y 7). Por lo tanto, los resultados muestran que el tratamiento combinado de PEGPH20 y anti-PD-L1 humano incrementó la accesibilidad de anti-PD-L1 a los tumores con alto contenido de HA de una manera específica para el anti-PD-L1.

Tabla 30. Resultados: Recuento de píxeles positivos

Grupo	Tratamiento 1	Recuento de píxeles positivos; media ± ETM
1	tampón API	0
2	AF488-anti-PD-L1	320 ± 44

Tabla 30. Resultados: Recuento de píxeles positivos		
Grupo	Tratamiento 1	Recuento de píxeles positivos; media $\pm$ ETM
3	PEGPH20 + AF488-anti-PD-L1	884 $\pm$ 123
4	AF488-anti-PD-1	1014 $\pm$ 80
5	PEGPH20 + AF488-anti-PD-1	877 $\pm$ 73
6	AF488-anti-CTLA4	607 $\pm$ 86
7	PEGPH20 + AF488-anti-CTLA4	719 $\pm$ 121

Tabla 31. Resultados - Intensidad media de fluorescencia		
Grupo	Tratamiento 1	Intensidad fluorescencia; media $\pm$ ETM
1	tampón API	0
2	AF488-anti-PD-L1	5.847 $\pm$ 1.306
3	PEGPH20 + AF488-anti-PD-L1	15.074 $\pm$ 1.817
4	AF488-anti-PD-1	5.128 $\pm$ 797
5	PEGPH20 + AF488-anti-PD-1	4.177 $\pm$ 981
6	AF488-anti-CTLA4	7.384 $\pm$ 1.019
7	PEGPH20 + AF488-anti-CTLA4	7.645 $\pm$ 1.847

Ejemplo 13

Formulaciones de PH20 en liposomas multivesiculares (MVL)

Para la administración sistémica, se pueden preparar hialuronidasas, incluyendo hialuronidasas solubles, en vesículas lipídicas, tales como liposomas. Son ejemplos de estos los liposomas multivesiculares (MVL). Se prepararon varias formulaciones de liberación prolongada de liposomas multivesiculares con PH20 (MVL-PH20) utilizando el siguiente procedimiento general, véanse también la Solicitud Internacional PCT publicada Núm. WO 2012/109387 y la Publicación de Estados Unidos US-2013-0251786-A1. Las soluciones lipídicas contenían mezclas de varios lípidos neutros, incluyendo triglicéridos (TG) trioleína (C_{18:1}), tricaprilina (C_{8:0}) y colesterol, y lípidos con cargas tanto positivas como negativas, incluyendo fosfatidilcolinas (PC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC, C_{18:1}), dierucoilfosfatidilcolina (DEPC, C_{22:1}) y dipalmitoil fosforilglicerol (DPPG, C_{16:1}). La concentración total de PC fue hasta 19,8 mM, la concentración de colesterol fue de 30 mM, la concentración de TG fue hasta 3,9 mM y la concentración de DPPG fue 4,2 mM.

A. Generación de formulaciones MVL-PH20

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

Se prepararon formulaciones ilustrativas utilizando un Mini Vórtex o se prepararon a mayor escala utilizando un mezclador Omni (Omni Macro ES, Omni International, Kennesaw, GA). En el último método del mezclador Omni, la solución lipídica en cloroformo (6 mL) se emulsionó a 7.000 rpm durante 8 minutos con un Mezclador Omni con 6 mL de la primera solución acuosa (His-HCl 10 mM, pH 6,5 con sacarosa al 5% que contenía concentraciones variables de PH20) produciendo una emulsión de agua en aceite. Una emulsificación posterior a 4.500 rpm durante 1-3 minutos con 20 mL de una segunda solución acuosa de glucosa al 3,2% que contenía lisina 40 mM, pH 10,0, dio como resultado una segunda emulsión de agua en aceite en agua. La segunda emulsión se transfirió por igual a dos matraces Erlenmeyer y se añadió otra alícuota de 50 mL de la segunda solución acuosa a ambos matraces. El cloroformo se eliminó mediante lavado con nitrógeno sobre la superficie de la emulsión a 35°C. Las partículas de

5 MVL que contenían PH20 se lavaron tres veces con 50 mL de una tercera solución acuosa (tampón de His-HCl 25 mM, pH 6,0 que contenía NaCl 120 mM) añadiendo la solución, mezclando el tubo de centrifugación por inversión y centrifugación a 3.500 rpm durante 10 min. a 4°C en una centrífuga de mesa refrigerada. Finalmente, las partículas de MVL se resuspendieron en la tercera solución acuosa para formar una formulación de lipocrito de aproximadamente 50% y se almacenaron refrigeradas a 2-8°C. El procedimiento de Mini Vórtex fue similar, utilizando los parámetros expuestos en la Tabla 30.

La siguiente Tabla 32 resume la primera, segunda y tercera soluciones acuosas. La Tabla 32 también resume los volúmenes, las concentraciones de reactivos y otros parámetros de cada etapa del procedimiento de MVL.

Tabla 32. Parámetros de formulación y proceso de MVL-PH20					
1ª Solución acuosa	His-HCl 10 mM, pH 6,5 con sacarosa al 5%				
2ª Solución acuosa	Glucosa al 3,2% que contiene lisina 40 mM, pH 10,0				
3ª Solución acuosa	Tampón His-HCl 25 mM, pH 6,0 que contiene NaCl 120 mM				
Mezcla de la 1ª emulsión	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
PH20 en 1ª solución acuosa.	600 µL		6 mL		
Solución lipídica en cloroformo	600 µL		6 mL		
Volumen total	1,2 mL		12 mL		
Velocidad 1ª emulsificación	Máximas RPM		7000 RPM		
Tiempo	8 min		8 min		
Concentración de la proteína PH20 de partida (actividad)	0,25 mg/mL (30.000 U/mL)	0,5 mg/mL (60.000 U/mL)	0,5 mg/mL (60.000 U/mL)	1,0 mg/mL (120.000 U/mL)	2,0 mg/mL (240.000 U/mL)
PC	15,8-19,8 mM		15,8-19,8 mM		
Colesterol	30 mM		30 mM		
TG	3,75-3,9 mM		3,75-3,9 mM		
DPPG	4,2 mM		4,2 mM		
Tipo de cuchilla 1	No aplicable		Afilada en los lados		
Tipo de cuchilla 2	No aplicable		Afilada en los costados y en el interior		
Tipo de cuchilla 3	No aplicable		Toda plana, no afilada		
Mezcla de la 2ª emulsión	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
2ª solución acuosa	2,5 mL		20 mL		
Volumen total	3,7 mL		32 mL		
Velocidad	Máximas RPM		4500 RPM		
Tiempo	15 segundos		1-3 min		
Evaporación del disolvente	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
2ª solución acuosa	10 mL		100 mL		
Volumen total	13,7 mL		132 mL		
Velocidad del baño de agua con movimiento oscilante	100-130 RPM		100-130 RPM		
Tiempo	11 min		15 min		
Temperatura	35°C		35°C		
Lavado, intercambio de tampón y resuspensión	Mezclador Vortex		Mezclador Omni		
Muestra	Muestra entera		17 mL		
3ª Solución acuosa	50 mL		50 mL		

Lavado, intercambio de tampón y resuspensión	Mezclador Vortex	Mezclador Omni
Volumen total	50 mL	200 mL
Velocidad de centrifugación	3.500 RPM	3.500 RPM
Tiempo	10 min	10 min
Número de lavados	3	3
Volumen de resuspensión	0,3-0,5 mL	3-5 mL
LIPOCRITO	Mezclador Vortex	Mezclador Omni
Volumen del sedimento	Varía	Varía
3ª Solución acuosa	Varía	Varía
Velocidad	3.500 rpm	3.500 rpm
Tiempo (min)	10 min	10 min
Volumen de Solución + Sedimento	Varía	Varía
% Lipocrito Ajustado a	~50%	~50%

B. Resumen de las formulaciones de MVL-PH20 ilustrativas

Se prepararon varias formulaciones de MVL-PH20 que contenían razones molares variables de lípidos, PH20 y otros aditivos utilizando los mismos procedimientos generales descritos anteriormente. Los diversos aditivos adicionales fueron incluidos en la 1ª solución acuosa para mejorar y preservar la estabilidad de la PH20 encapsulada. Por ejemplo, las formulaciones F68 y F69 contenían cloruro de calcio. La formulación F82 contenía 150 µL de glicerol como una interfase que separaba la fase de 600 µL de cloroformo y la primera fase de la primera solución acuosa de 600 µL. La formulación F83 contenía dextrano 40.000 al 0,1% y PEG-6000 al 0,1%. Las formulaciones F85-F87 contenían oligómeros de ácido hialurónico (HA). Varias formulaciones diferían en sus procedimientos de mezclado/emulsificación. Por ejemplo, para la formulación F66, la primera etapa de emulsificación se llevó a cabo durante 4 minutos, en lugar de 8 minutos, dando como resultado bolitas liposomales más pequeñas. La formulación F67 se mezcló con una rueda del rotor, en lugar de un Mini Vórtex para generar una menor cizalla durante la mezcla.

La siguiente Tabla 33 presenta varias formulaciones de MVL-PH20, que contienen el número de formulación, las razones en % en moles de PC (fosfatidilcolina) y TG (triglicéridos) de la formulación, la concentración inicial de PH20 en mg/mL, el mezclador utilizado para preparar las emulsiones, y cualquier aditivo que haya sido incluido en la primera solución acuosa.

Tabla 33 Formulaciones de MVL con PH20				
Formulación	Razón en % en moles de PC y TG en la formulación	Concentración de PH20 inicial en mg/mL	Mezclador	Aditivos en la primera solución acuosa
F40	DEPC con Trioleína	0,25	Mini Vortex	N/A
F41	DEPC con Trioleína	0	Mini Vortex	N/A
F42	DEPC con Trioleína	Marcada con fluorescencia 0,25	Mini Vortex	PH20 marcada con AlexaFluor 488
F53	DEPC/DOPC 25/75;	0,25	Mini Vortex	N/A
	Trioleína/Tricap25/75			
F54	DEPC/DOPC 50/50;	0,25	Mini Vortex	N/A
	Trioleína/Tricap 50/50			
F55	DEPC/DOPC 75/25;	0,25	Mini Vortex	N/A
	Trioleína/Tricap 75/25			
F56	DEPC/DOPC 90/10;	0,25	Mini Vortex	N/A

Tabla 33 Formulaciones de MVL con PH20

Formulación	Razón en % en moles de PC y TG en la formulación	Concentración de PH20 inicial en mg/mL	Mezclador	Aditivos en la primera solución acuosa
	Trioleína/Tricap 90/10			
F61	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Omni	N/A
F66	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex ¹	N/A
F67	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Rueda de rotor	N/A
F68	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex	CaCl ₂ 20 mM
F69	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Mini Vortex	CaCl ₂ 10 mM
F70	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,0	Omni	N/A
F71	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,25	Omni	N/A
F72	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,5	Omni	N/A
F73	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,5	Omni	N/A
F74	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	N/A
F75	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	2,0	Omni	N/A
F77 ²	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	
F78	DEPC con Trioleína	1,0	Omni	N/A
F79	DEPC con Trioleína	1,0	Omni	N/A
F80	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	N/A
F81	DEPC con Trioleína	0,5	Omni	N/A
F82	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	0,5	Mini Vortex	150 µL de glicerol como interfase
F83	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni	Dextrano 40.000 al 0,1% PEG-6000 al 0,1%
F84	DEPC/DOPC 50/50; Trioleína/Tricap 50/50	1,0	Omni ³	N/A

Tabla 33 Formulaciones de MVL con PH20				
Formulación	Razón en % en moles de PC y TG en la formulación	Concentración de PH20 inicial en mg/mL	Mezclador	Aditivos en la primera solución acuosa
F85	DEPC/DOPC 50/50;	1,0	Omni	15 mg/mL HA 74.000
	Trioleina/Tricap 50/50			
F85R1	DEPC/DOPC 50/50;	1,0	Omni	15 mg/mL HA 74.000
	Trioleina/Tricap 50/50			
F86	DEPC/DOPC 50/50;	1,0	Omni	50 mg/mL HA 74.000
	Trioleina/Tricap 50/50			
F87	DEPC/DOPC 50/50;	1,0	Omni	Prolina 100 mM
	Trioleina/Tricap 50/50			
F88	DEPC/DOPC 50/50;	1,0	Omni	Arg-HCl 100 mM, pH 6,44
	Trioleina/Tricap 50/50			
F89	DEPC/DOPC 50/50;	1,0	Omni	Sorbitol al 6%
	Trioleina/Tricap 50/50			
F90	DEPC/DOPC 50/50;	1,0	Omni	Trehalosa al 6%
	Trioleina/Tricap 50/50			

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

²Colesterol derivado de animales utilizado en lugar de colesterol derivado de plantas en la solución lipídica

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

Las modificaciones de los ejemplos serán evidentes para los expertos en esta técnica. Por consiguiente, esta invención debe limitarse únicamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Halozyme, Inc.
Rosengren, Sanna
Thompson, Curtis B.
Shepard, H. Michael

<120> TERAPIA COMBINADA CON UNA
ENZIMA DE DEGRADACIÓN DE HIALURONANO E INHIBIDOR DE PUNTOS DE CONTROL INMUNITARIO

<130> 33320.03122.WO01/3122PC

<140> Aún no asignada
<141> Adjunto

<150> US 62/043,351
<151> 28-08-2014

<160> 320

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1
<211> 10836
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pLV-EF1a-hHAS3-1RES-Hyg

<400> 1

```

aagcttaatg tagtcttatg caatactctt gtagtcttgc aacatggtaa cgatgagtta 60
gcaacatgcc ttacaaggag agaaaaagca ccgtgcatgc cgattggtgg aagtaagggtg 120
gtacgatcgt gccttattag gaaggcaaca gacgggtctg acatggattg gacgaaccac 180
tgaattgccg cattgcagag atattgtatt taagtgccta gctcgataca taaacgggtc 240
tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300
taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtg 420
cgcccgaaaca gggacttgaa agcgaaaagg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggg gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa 540
attttgacta gcgagagcta gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg 600
gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cggttaaggc cagggggaaa gaaaaaatat 660
aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc 720
ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
caaaggatag agataaaaaga caccaaggaa gcttttagaca agatagagga agagcaaaaac 900
aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
agtagcaccc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggag cagcgtcaat 1140
gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
gctgagggct attgagcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat 1320
ttggggttgc tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagtggag 1380
taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcactgg atggagtggg acagagaaat 1440
taacaattac acaagcttaa tacaactcct aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
aacaaattgg ctgtgtgata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
atcgtttcag acccacctcc caaccccgag gggacccgac aggccgaag gaatagaaga 1740
agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctgcacggt 1800

```

tcggttaact	ttttaaagaa	aaggggggat	tgggggggtac	agtgcagggg	aaagaatagt	1860
agacataata	gcaacagaca	tacaaactaa	agaattacaa	aaacaaatta	caaaattcaa	1920
aattttatcg	atgcctcccc	gtcaccaccc	cccccaaccc	gccccgaccg	gagctgagag	1980
taattcatac	aaaaggactc	gcccctgcct	tggggaatcc	cagggaccgt	cgtaaactc	2040
ccactaacgt	agaacccaga	gatcgctgcg	ttcccgcgcc	ctcaccgcgc	cgctctcgtc	2100
atcactgagg	tggagaagag	catgctgtag	gctccggtgc	ccgtcagtgg	gcagagcgca	2160
catcgcccac	agtcctccgag	aagttggggg	gaggggtcgg	caattgaacc	ggtgcctaga	2220
gaaggtggcg	cggggtaaac	tgggaaagtg	atgtcgtgta	ctggctccgc	cttttccccc	2280
aggggtgggg	agaaccgtat	ataagtgcag	tagtcgccgt	gaacgttctt	tttcgcaacg	2340
ggtttgccgc	cagaacacag	gtaagtgcgc	tgtgtggttc	ccgcgggcct	ggcctcttta	2400
cggttatatg	cccttgcggt	ccttgaatta	cttccacgcc	cctggctgca	gtacgtgatt	2460
cttggtccac	agcttcgggt	tgggaagtgg	tgggagagtt	cgaggccttg	cgcttaagga	2520
gccccttcgc	ctcgtgcttg	agttgagggc	tggcctgggc	gctggggccg	ccgctgcca	2580
atctggtggc	accttcgcgc	ctgtctcgct	gctttcgata	agtctctagc	catttaaaat	2640
ttttgatgat	atcctgcgac	gctttttttc	tggcaagata	gtcttgtaaa	tgcggggcaa	2700
gatctgcaca	ctggtatttc	ggtttttggg	gcccgcggcg	gcgacggggc	ccgtgcctcc	2760
cagcgacacat	gttcggcgag	gcggggcctg	cgagcgccgc	caccgagaaat	cggacggggg	2820
tagtctcaag	ctggccggcc	tgtctggttg	cctggcctcg	cgccgccttg	tatcgccccc	2880
ccctggggcg	caagctggc	ccggtcggca	ccagttgcgt	gagcggaag	atggcccgctt	2940
ccctgcccct	ctcaggggag	ctcaaatgg	aggacgcggc	gctcgggaga	gcgggcgggt	3000
gagtcaccca	cacaaaggaa	aagggccttt	ccgtcctcag	ccgtcgcttc	atgtgactcc	3060
acggagtacc	gggcgccgtc	caggcacctc	gattagttct	cgagcttttg	gagtacgtcg	3120
tcttttaggtt	ggggggaggg	gttttatgcg	atggagtttc	cccacactga	gtgggtggag	3180
actgaagctta	ggccagcttg	gcacttgatg	taattctcct	tggaaattgc	cctttttgag	3240
tttgatctct	ggttcattct	caagcctcag	acagtggttc	aaagtttttt	tcttccattt	3300
caggtgtcgt	gaaaactacc	cctctagacc	cgggccacca	tgccggtgca	gctgacgaca	3360
gccctgcgtg	tgggtggcac	cagcctgttt	gccctggcag	tgctgggtgg	catcctggca	3420
gcctatgtga	cgggctaccac	gttcatccac	acggaaaagc	actacctgtc	cttcggcctg	3480
tacggcgcca	tcctgggcct	gcacctgtct	attcagagcc	tgtttgcctt	cctggagcac	3540
cgggcgatgc	gacgtgcccg	ccaggccctg	aagctgcctt	ccccgcggcg	gggctcggtg	3600
gcactgtgca	ttgccgcata	ccaggaggac	cctgactact	tgcgcaagtg	cctgcgctcg	3660
gcctagctga	tctccttccc	tgacctcaag	gtggtcatgg	tgggtgattg	caaccgcctg	3720
gaggacgcct	acatgctgga	catcttccac	gaggtgctgg	gcggcaccca	gcaggccggc	3780
ttctttgtgt	ggcgagcaaa	cttccatgag	gcaggcgagg	gtgagacgga	ggccagcctg	3840
caggagggca	tggaccgtgt	gcgggatgtg	gtgcgggcca	gcaccttctc	gtgcatcatg	3900
cagaagctga	gggcaagcg	cgaggtcatg	tacacggcct	tcaaggccct	cggcgattcg	3960
gtggactaca	tccaggtgtg	cgactctgac	actgtgctgg	atccagcctg	caccatcgag	4020
atgcttcgag	tcctggagga	ggatccccaa	gtagggggag	tcgggggaga	tgtccagatc	4080
ctcaacaagt	acgactcatg	gatttccttc	ctgagcagcg	tgcggtaactg	gatggccttc	4140
aacgtgggca	gggcctgcc	gtcctacttt	ggctgtgtgc	agtgtattag	tgggccttgc	4200
ggcatgtacc	gcaacagcct	cctccagcag	ttcctggagg	actggtacca	tcagaagttc	4260
ctaggcgaca	agtgcagctt	cggggatgac	cggcacctca	ccaaccgagt	cctgagcctt	4320
ggctaccgaa	ctaagtatac	cgcgcgctcc	aagtgcctca	cagagacccc	cactaagtac	4380
ctccgggtgg	tcaaccagca	aaccgcctgg	agcaagtctt	acttccggga	gtggctctac	4440
aactctctgt	ggttccataa	gcaccacctc	tggatgacct	acgagtcagt	ggtcacgggt	4500
ttcttcccct	tcttcctcat	tgccacggtt	atacagcttt	tctaccgggg	ccgcatctgg	4560
aacattctcc	tcttcctgct	gacggtgcag	ctgggtggca	ttatcaaggc	cacctacgcc	4620
tgcttccttc	ggggcaatgc	agagatgac	ttcatgtccc	tctactccct	cctctatatg	4680
tccagccttc	tgccggccaa	gatctttgac	attgctacca	tcaacaaatc	tggctggggc	4740
acctctggcc	gaaaaacat	tgtggtgaac	ttcattggcc	tcattcctgt	gtccatctgg	4800
gtggcagttc	tcctgggagg	gctggcctac	acagcttatt	gccaggacct	gttcagttag	4860
acagagctag	ccttccttgt	ctctggggct	atactgtatg	gctgctactg	ggtggccctc	4920
ctcatgctat	atctggccat	catcgcccg	cgatgtggga	agaagccgga	gcagtacagc	4980
ttggcttttt	ctgaggtgta	gacgcgtctc	cggcctaggg	ataacaggg	aatccgctag	5040
cccctctccc	tccccccccc	ctaacgttac	tggccgaagc	cgcttggaat	aaggccggtg	5100
tgcgtttgtc	tatatgttat	tttccaccat	attgcgctct	tttggcaatg	tgagggcccg	5160
gaaacctggc	cctgtcttct	tgacgagcat	tcctaggggt	ctttcccttc	tcgccaagg	5220
aatgcaaggt	ctgttgaatg	tcgtgaagga	agcagttcct	ctggaagctt	cttgaagaca	5280
aacaacgtct	gtagcgaccc	tttgacggca	gcggaacccc	ccacctggcg	acaggtgcct	5340
ctgcggccaa	aagccacgtg	tataagatac	acctgcaaag	gcggcacaa	cccagtgcca	5400
cgttgtgagt	tggatagttg	tggaaaagagt	caaagtggctc	tcctcaagcg	tattcaacaa	5460
ggggctgaag	gatgcccaga	aggtacccca	ttgtatggga	tctgatctgg	ggcctcggtg	5520
cacatgcttt	acatgtgttt	agtcgaggtt	aaaaaaacgt	ctaggccccc	cgaaccacgg	5580

ES 2 727 137 T3

ggacgtgggt	ttcctttgaa	aaacacgatg	ataatatggc	cacactagag	atccaccggt	5640
cgccaccatg	aaaaagcctg	aactcaccgc	gacgtctgtc	gagaagtctc	tgatcgaaaa	5700
gttcgacagc	gtctccgacc	tgatgcagct	ctcggagggc	gaagaatctc	gtgctttcag	5760
cttcgatgta	ggaggcgctg	gatatgtcct	gcgggtaaat	agctgcgcgc	atggtttcta	5820
caaagatcgt	tatgtttatc	ggcactttgc	atcgcccgcg	ctcccatttc	cggaagtgtc	5880
tgacattggg	gaattcagcg	agagcctgac	ctattgcatc	tcccgcctgt	cacagggtgt	5940
cacgttgcaa	gacctgcctg	aaaccgaact	gcccgtctgt	ctgcagcccg	tcgaggaggc	6000
catggatgcg	atcgctgcgc	ccgatcttag	ccagacgagc	gggttcggcc	cattcggaac	6060
gcaaggaatc	ggccaataca	ctacatggcg	tgatttcata	tgcgcgattg	ctgatcccca	6120
tgtgtatcac	tggcaaaactg	tgatggacga	caccgtcagt	gcgtccgtcg	cgcaggctct	6180
cgatgagctc	atgctttggg	ccgaggactg	ccccgaagtc	cggcacctcg	tgcacgcgga	6240
tttcggctcc	aacaatgtcc	tgcaggacaa	tggccgcata	acagcggtca	ttgatggag	6300
cgagcgcatg	ttcggggatt	cccaatacga	ggtcgcgaac	atcttctctc	ggaggccgtg	6360
gttggtctgt	atggagcagc	agacgcgcta	cttcgagcgg	aggcatccgg	agcttgacgg	6420
atcgccgcgg	ctccgggctg	atatgctccg	cattggtctt	gaccaactct	atcagagctt	6480
gggtgacgga	aatttcogact	atgcagcttg	ggcgaggggt	cgatgcgacg	caatcgccg	6540
atccggagcc	gggactgtcg	ggcgtaacaca	aatcgccgcg	agaagcgccg	ccgtctggac	6600
cgatggctgt	gtagaagtac	tcgccgatag	tggaaaacga	cgccccagca	ctcgtccgag	6660
ggcaaaaggaa	taggcggccg	cgtcgacaat	caacctctgg	attacaaaa	ttgtgaaaaga	6720
ttgactggta	ttcttaacta	tgtgtctcct	tttacgctat	gtggatacgc	tgctttaatg	6780
cctttgtatc	atgctattgc	ttcccgatg	gctttcattt	tctcctcctt	gtataaatcc	6840
tggttgctgt	ctctttatga	ggagttgtgg	cccgttgtca	ggcaacgtgg	cgtgggtgtc	6900
actgtgtttg	ctgacgcaac	ccccactgg	tggggcattg	ccaccacctg	tcagctcctt	6960
tccgggctct	tcgctttccc	cctccctatt	gccacggcgg	aactcatcgc	cgctctcctt	7020
gcccgctgct	ggacaggggc	tcggctgttg	ggcactgaca	attccgtgg	gttgtcgggg	7080
aagctgacgt	cctttccatg	gctgctcgcc	tgtgttgcca	cctggattct	gcgcgggacg	7140
tccttctgct	acgtcccttc	ggccctcaat	ccagcggacc	ttccttccc	cgccctgtct	7200
ccggctgact	ggcctcttcc	gcgtcttcgc	cttcgccttc	agacgagtgc	gatctccctt	7260
tggcgccgct	ccccgcctgg	aattcgagct	cggtaccctt	aagaccaatg	acttacaagg	7320
cagctgtaga	tcttagccac	ttttttaaag	aaaagggggg	actggaagg	ctaattcact	7380
cccaacgaag	acaagatctg	ctttttgctt	gtactgggtc	tctctggtta	gaccagatct	7440
gagctgagta	gctcactgta	taactagggg	accactgct	taagcctcaa	taagcttcc	7500
cttgagtgtc	tcaagtagtg	tgtgcccgtc	tgttgtgtga	ctctggtaac	tagagatccc	7560
tcagaccctt	ttagtcagtg	tggaaaatct	ctagcagtag	tagttcatgt	catcttatta	7620
ttcagtattt	ataacttgca	aagaaatgaa	tatcagagag	tgagaggaac	ttgtttattg	7680
cagcttataa	tgtttacaaa	taaaagcaaa	gcatacacia	tttcacaaat	aaagcttatt	7740
tttcaactgca	ttctagtgtg	ggtttgtcca	aactcatcaa	tgtatcttat	catgtctggc	7800
tctagctatc	ccgcccttaa	ctccgcccat	cccgcccta	actccgccca	gttccgccca	7860
ttctccgccc	catggtgac	taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	ccgcctcgcc	7920
ctctcgacta	ttccagaagt	agtgaggagg	cttttttgga	ggcctaggga	cgtaccctaa	7980
tcgccctata	gtgagtcgta	ttacgcgcgc	tcactggccg	tcgttttaca	acgtcgtgac	8040
tgggaaaacc	ctggcgttac	ccaacttaat	cgccttgacg	cacatcccc	tttcgccagc	8100
tggcgtaata	gcgaagaggc	ccgcaccgat	cgccttccc	aacagttgcg	cagcctgaat	8160
ggcgaaatgg	acgcgccctg	tagcggcgca	ttaagcgccg	cgggtgtggt	ggttacgcgc	8220
agcgtgaccg	ctacacttgc	cagcgcctca	gcgccgctc	ctttcgcttt	cttcccttcc	8280
tttctcgcca	cgttcgccgg	ctttcccggt	caagctctaa	atcgggggct	ccctttagg	8340
ttccgattta	gtgctttacg	gcacctcgac	ccccaaaaac	ttgattagg	tgatggttca	8400
cgtagtgggc	catcgccctg	atagacggtt	tttcgccctt	tgacgttgga	gtccacgttc	8460
tttaatatgt	gactcttgtt	ccaaactgga	acaactca	accctatctc	ggtctattct	8520
tttgatttat	aagggttttt	gccgatttgc	gcctattggt	taaaaaatga	gctgatttaa	8580
caaaaattta	acgcgaattt	taacaaaata	ttaacgctta	caatttaggt	ggcacttttc	8640
ggggaaatgt	gcgcggaacc	cctatttgtt	tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	8700
cgctcatgag	acaataacc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatga	8760
gtattcaaca	tttcgtgtc	gcccttattc	ccttttttgc	ggcattttgc	cttctgtttt	8820
ttgctcacc	agaaacgctg	gtgaaagtaa	aagatgctga	agatcagttg	ggtgcacgag	8880
tgggttacat	cgaactggat	ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtgtt	cgccccgaag	8940
aacgttttcc	aatgatgagc	acttttaaa	ttctgctatg	tggcgcggtta	ttatcccgtta	9000
ttgacgcgg	gcaagagcaa	ctcggtcgcc	gcatacacta	ttctcagaat	gacttggttg	9060
agtactcacc	agtcacagaa	aagcatctta	cggatggcat	gacagtaaga	gaattatgca	9120
gtgctgccat	aacctatgag	gataacactg	cggccaactt	acttctgaca	acgatcgag	9180
gaccgaagga	gctaaccgct	tttttgacaca	acatggggga	tcatgtaact	cgccttgatc	9240
gttggggaacc	ggagctgaat	gaagccatac	caaacgacga	gcgtgacacc	acgatgcctg	9300
tagcaatggc	aacaacgttg	cgcaactat	taactggcga	actacttact	ctagcttccc	9360

```

ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg 9420
cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgg 9480
gtatcatttg agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagt atctacacga 9540
cggggagtcg ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac 9600
tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag tttactcata tatacttttag attgatttaa 9660
aacttcattt ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca 9720
aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 9780
gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac 9840
cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 9900
ctggcttcag cagagcgag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc 9960
accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag 10020
tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccggggt ggactcaaga cgatagttac 10080
cggataaagg gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgaggc 10140
gaacgacctc caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc 10200
ccgaaggag aaaggcgag aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca 10260
cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcggccac 10320
tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg 10380
ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct 10440
ttcctgcgtt atccccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata 10500
ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc 10560
gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg 10620
acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca 10680
ctcattaggc accccaggct ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg 10740
tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagcgcgcaa 10800
ttaaccctca ctaaaggga caaaagctgg agctgc 10836

```

<210> 2
 <211> 1662
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ADNc de hialuronano sintasa 3 humana, variante del transcrito 1

<400> 2

```

atgccgggtgc agctgacgac agccctgcgt gtggtgggca ccagcctggt tgcctgggca 60
gtgctgggtg gcatcctggc agcctatgtg acgggctacc agttcatcca cacggaaaag 120
cactacctgt ccttcggcct gtacggcgcc atcctgggcc tgcacctgct cattcagagc 180
ctgtttgcct tcctggagca ccggcgcatg cgacgtgccg gccaggccct gaagctgccc 240
tccccgcggc ggggctcggg ggcaactgtg attgccgat accaggagga cctgactac 300
ttgcgcaagt gcctgcgctc ggcccagcgc atctccttcc ctgacctcaa ggtggtcatg 360
gtggtggatg gcaaccgcca ggaggacgcc tacatgctgg acatcttcca cgagggtgctg 420
ggcggcaccg agcaggccgg cttctttgtg tggcgagca acttccatga ggcaggcgag 480
ggtgagacgg agggcagcct gcaggagggc atggaccgtg tgcgggatgt ggtgcggggc 540
agcaccttct cgtgcatcat gcagaagtgg ggaggcaagc gcgaggtcat gtacacggcc 600
ttcaaggccc tcggcgattc ggtggactac atccaggtgt gcgactctga cactgtgctg 660
gatccagcct gcaccatcga gatgcttcca gtctggagg aggatcccca agtaggggga 720
gtcgggggag atgtccagat cctcaacaag tacgactcat ggatttctt cctgagcagc 780
gtcgggtact ggatggcctt caacgtggag cgggcctgcc agtcctactt tggctgtgtg 840
cagtgtatta gtgggccctt gggcatgtac cgcaacagcc tcctccagca gttcctggag 900
gactggtacc atcagaagtt cctaggcagc aagtgcagct tcggggatga ccggcacctc 960
accaaccgag tcctgagcct tggctaccga actaagtata ccgcgcgctc caagtgcctc 1020
acagagaccc ccactaahta cctccgggtg ctcaaccagc aaacccgctg gagcaagtct 1080
tacttccggg agtggtctta caactctctg tggttccata agcaccacct ctggatgacc 1140
tacgagtcag tggtcacggg tttcttcccc ttcttctca ttgccacggg taticagctt 1200
ttctaccggg gccgcatctg gaacattctc ctcttctctg tgacggtgca gctggtggg 1260
attatcaagg ccacctacgc ctgcttctt cggggcaatg cagagatgat cttcatgtcc 1320
ctctactccc tcctctatat gtccagcctt ctgccggcca agatctttgc cattgctacc 1380
atcaacaaat ctggctgggg cacctctggc cgaaaaacca ttgtggtgaa cttcattggc 1440
ctcattcctg tgtccatctg ggtggcagtt ctctgggag ggctggccta cacagcttat 1500
tgccaggacc tgttcagtga gacagagcta gccttctctg tctctggggc tatactgtat 1560
ggctgctact ggggtggcct cctcatgcta tatctggcca tcatcgccc gcgatgtggg 1620
aagaagccgg agcagtacag cttggctttt gctgaggtgt ag 1662

```

<210> 3
 <211> 9197
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pLV-EF1a-MCS-IRES-Hyg

<400> 3

```

aagcttaatg tagtcttatg caatactctt gtagtcttgc aacatggtaa cgatgagtta 60
gcaacatgcc ttacaaggag agaaaaagca ccgtgcatgc cgattggtgg aagtaaggta 120
gtacgatcgt gccttattag gaaggcaaca gacgggtctg acatggattg gacgaaccac 180
tgaattgccg cattgcagag atattgtatt taagtgccta gctcgataca taaacgggtc 240
tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300
taagcctcaa taaagcttgc cttagagtgc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaatatct ctacgagtgg 420
cgcccgaaac gggacttgaa agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
cggtctgctg aagcgcgcac ggcaagaggg gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa 540
atcttgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtcgc agagcgtcag tattaagcgg 600
gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cgggttaaggc cagggggaaa gaaaaaatat 660
aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gactagaac gattcgcagt taatcctggc 720
ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
caaaggatag agataaaaga caccaaggaa gctttagaca agatagagga agagcaaaac 900
aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
agtagcaccac accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaaag actatgggag cagcgtcaat 1140
gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcataagca 1260
gctccaggca agaactcctgg ctgtggaaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat 1320
ttggggttgc tctggaaaac tcatctgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagtgtggag 1380
taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcactggg atggagtggg acagagaaat 1440
taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
aacaatttgg ctgtgtgtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
atcgtttcag acccacctcc caaccccgag gggacccgac aggcccgaa gaaatagaaga 1740
agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctgcagcgta 1800
tcgggttaact tttaaaagaa aaggggggat aggggggtac agtgcaaggg aaagaatagt 1860
agacataata gcaacagaca tacaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaattcaa 1920
aatTTTTatcg atgcctcccc gtcaccaccc cccccaaccc gccccgaccg gagctgagag 1980
taattcatac aaaaggactc gccctgcctc tggggaatcc cagggaccgt cgttaaactc 2040
ccactaacgt agaaccagag gatcgctgag gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca 2100
atcactgagg tggagaagag catgcgtgag gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca 2160
catcgcccac agtccccgag aagttggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga 2220
gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagt atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg 2280
aggggtgggg agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg 2340
ggtttgccgc cagaacacag gtaagtgcgc tgtgtggttc ccgcgggcct ggccctctta 2400
cgggttatgg cccttgctg ccttgaatta cttccacgcc cctggctgca gtacgtgatt 2460
cttgatcccg agcttcgggt tggagagtgg tgggagagtt cgaggccttg cgcttaagga 2520
gcccccttcg ctcgtgcttg agttgaggcc tggcctgggc gctggggccg ccgctgcca 2580
atctggtggc accttcgcgc ctgtctcgct gctttcgata agtctctagc catttaaaat 2640
ttttgatgat atcctgcgcg gctttttttc tggcaagata gtcttgtaa tgccggccaa 2700
gatctgcaca ctggtatttc ggttttttgg gcgcggggcg gcgacggggc ccgtgcgtcc 2760
cagcgcacat gttcggcgag gcggggcctg cgagcgcggc caccgagaa cggacggggg 2820
tagtctcaag ctggccggcc tgcctcgttg cctggcctcg cgccgccgtg tatcgcccg 2880
ccctgggcgg caaggctggc ccggtcggca ccagttgcgt gagcggaaa atggccgctt 2940
cccggccctg ctgcagggag ctcaaaatgg aggacgcggc gctcgggaga gcgggagggt 3000

```

gagtcaccca	cacaaaggaa	aagggccttt	ccgtcctcag	ccgtcgcttc	atgtgactcc	3060
acggagtacc	ggggcgccgtc	caggcacctc	gattagttct	cgagcttttg	gagtacgtcg	3120
tcttttaggtt	ggggggagg	gttttatgcg	atggagtttc	cccacactga	gtgggtggag	3180
actgaagtta	ggccagcttg	gcacttgatg	taattctcct	tgggaatttg	cctttttgag	3240
tttgatctct	ggttcattct	caagcctcag	acagtggttc	aaagtttttt	tcttccattt	3300
caggtgtcgt	gaaaactacc	cctctagata	atacgactca	ctatagggcc	cgggttggtat	3360
ccacgcgtct	ccggcctagg	gataacagg	taatccgcta	gccccctctc	ctcccccccc	3420
cctaacgtta	ctggccgaag	ccgcttgga	taaggccggt	gtgcgtttgt	ctatatgtta	3480
ttttccacca	tattgccgtc	ttttggcaat	gtgaggcccc	ggaaacctgg	ccctgtcttc	3540
ttgacgagca	ttcctagggg	tctttccctc	ctcgccaaag	gaatgcaagg	tctgttgaat	3600
gtcgtgaagg	aagcagttcc	tctggaagct	tcttgaagac	aaacaacgtc	tgtagcgacc	3660
ccttgacagg	agcggaaacc	cccactggc	gacagtgccc	tctgcggcca	aaagccactg	3720
gtataagata	cacctgcata	ggcgccacaa	ccccagtgcc	acgttgtgag	ttggatagtt	3780
gtggaagag	tcaaatggct	ctcctcaagc	gtattcaaca	aggggctgaa	ggatgccccag	3840
aaggtacccc	attgtatggg	atctgatctg	gggcctcggt	acacatgctt	tacatgtgtt	3900
ctgacgttta	taaaaaacg	tctaggcccc	ccgaaccacg	gggacgtggt	tttcttttga	3960
aaaacacgat	gataatatgg	ccacactaga	gatccaccgg	tcgccaccat	gaaaaagcct	4020
gaactcaccg	cgacgtctgt	cgagaagttt	ctgatcgaaa	agttcgacag	cgtctccgac	4080
ctgatgcagc	tctcgagggg	cgaagaatct	cgtgctttca	gcttcgatgt	aggaggcggt	4140
ggatgatgcc	tgccggtaaa	tagctgcgcc	gatggtttct	acaaagatcg	ttatgtttat	4200
cggcactttg	catcgccgc	gctcccgatt	ccggaagtgc	ttgacattgg	ggaattcagc	4260
gagagcctga	cctattgcat	ctcccgccgt	gcacagggtg	tcacgttgca	agacctgcct	4320
gaaaccgaac	tgcccgcgtg	tctgcagccg	gtcgcgagg	ccatggatgc	gatcgctgcg	4380
gccgatcttc	gccagacgag	cgggttcggc	ccattcggac	cgcaaggaa	cggccaatac	4440
actacatggc	gtgatttcat	atgcgcgatt	gctgatcccc	atgtgtatca	ctggcaaaact	4500
gtgatggacg	acaccgtcag	tgctgctcgc	gcgcaggctc	tcgatgagct	gatgctttgg	4560
gccgaggact	gccccgaagt	ccggcacctc	gtgcacgcgg	atttcggctc	caacaatgtc	4620
ctgacggaca	atggccgcat	aacagcggtc	attgactgga	gcgaggcgat	gttcggggat	4680
tcccaatacg	aggtcgccaa	catcttcttc	tggaggccgt	ggttggcttg	tatggagcag	4740
cagacgcgct	acttcgagcg	gaggcatccg	gagcttgca	gatcgccgcg	gctccggcg	4800
tatatgctcc	gcattgggtc	tgaccaactc	tatcagagct	tgggtgacgg	caatttcgat	4860
gatctgctcc	gggcgcagg	tcgatgcgac	gcaatcgtcc	gatccggagc	cgggactgct	4920
gggcgtacac	aaatcgcccc	cagaagcgcg	gccgtctgga	ccgatggctg	tgtagaagta	4980
ctcgccgata	gtggaacccg	acgccccagc	actcgtccga	gggcaaaagg	ataggcgcc	5040
gcgtcgacaa	tcaacctctg	gattacaaaa	tttgtgaaag	attgactggt	attcttaact	5100
atgttgctcc	ttttacgtta	tgtggatacg	ctgctttaat	gcctttgtat	catgctttg	5160
cttcccgat	ggctttcatt	ttctcctcct	tgtataaatc	ctgggtgctg	tctctttatg	5220
aggagttgtg	gcccgtttgtc	aggcaacgtg	gcgtggtgtg	cactgtgttt	gctgacgcaa	5280
ccccactgg	ttggggcatt	gccaccacct	gtcagctcct	ttccgggact	ttcgctttcc	5340
ccctccctat	tgccacggcg	gaactcatcg	ccgcctgcct	tgcccgcgtc	tggacagggg	5400
ctcggtgtgt	gggcactgac	aattccgtgg	tgttgtcggg	gaagctgacg	tcctttccat	5460
ggctgctcgc	ctgtgttgcc	acctggattc	tgccgcgggac	gtcctttctg	tacgtccctt	5520
cggccctcaa	tccagcggac	cttcttctcc	gcggcctgct	gcccgtctcg	cggcctcttc	5580
cgcgtcttcg	ccttcgccct	cagacgagtc	ggatctccct	ttgggcccgc	tccccgcctg	5640
gaattcgagc	tcggtacctt	taagaccaat	gacttacaag	gcagctgtag	atcttagcca	5700
ctttttaaaa	gaaaaagggg	gactggaagg	gctaattcac	tcccaacgaa	gacaagatct	5760
gctttttgct	tgtactgggt	ctctctggtt	agaccagatc	tgagcctggg	agctctctgg	5820
ctaactagg	aaccactgct	ttaagcctca	ataaagcttg	ccttgagtgc	ttcaagtagt	5880
gtgtgcccgt	ctgttgtgtg	actctggtaa	ctagagatcc	ctcagacctt	tttagtcagt	5940
gtggaataat	tctagcagta	gtagtcatg	tcatcttatt	attcagtatt	tataacttgc	6000
aaagaaatga	atatcagaga	gtgagaggaa	cttgtttatt	gcagcttata	atggttacaa	6060
ataaagcaat	agcatcacaa	atttcacaaa	taaagcattt	ttttcactgc	attctagtgt	6120
tggtttgtcc	aaactcatca	atgtatctta	tcatgtctgg	ctctagctat	cccgcctcta	6180
actccgcccc	tcccgccctt	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	6240
ctaatttttt	ttattttatg	agaggccgag	gcgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	6300
tagtgaggag	gcttttttgg	aggcctagg	acgtacccaa	ttcgccctat	agtgagtcgt	6360
attacgcgcg	ctcactggcc	gtcgttttac	aacgtcgtga	ctgggaaaac	cctggcggtta	6420
cccaacttaa	tcgccttgca	gcacatcccc	ctttcgccag	ctggcgtaat	agcgaagagg	6480
cccgacccga	tcgcctttcc	caacagtgtc	gcagcctgaa	tggcgaaatg	gacgcgccct	6540
gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	cagcgtgacc	gctacacttg	6600
ccagcgcctt	agcgcgcgct	cctttcgctt	tcttcccttc	ctttctcgcc	acgttcgcgc	6660
gctttccccc	tcaagctcta	aatcgggggc	tccctttagg	gttccgattt	agtgcctttac	6720
ggcacctcga	ccccaaaaaa	cttgattagg	gtgatggttc	acgtagtggg	ccatcgccct	6780

gatagacggt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacggt	ctttaatagt	ggactcttgt	6840
tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cggctctattc	ttttgattta	taagggattt	6900
tgcgcatctc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaatth	aacgcgaatt	6960
ttacaaaaat	attaacgctt	acaatttagg	tggcactttt	cggggaaatg	tgcgcggaac	7020
ccctatttgt	ttatttttct	aaatacattc	aaatatgtat	ccgctcatga	gacaataacc	7080
ctgataaatg	cttcaataat	attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	atttccgtgt	7140
cgccttattt	cccttttttg	cggcattttg	ccttcctgtt	tttgctcacc	cagaaacgct	7200
ggtgaaagta	aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	tcgaactgga	7260
tctcaacagc	ggtaagatcc	ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	7320
cactttttaa	gttctgctat	gtggcgcggt	attatcccgt	attgacgcgg	ggcaagagca	7380
actcggctgc	cgcatacact	attctcagaa	tgacttggtt	gagtactcac	cagtcacaga	7440
aaagcatctt	acggatggca	tgacagtaag	agaattatgc	agtgcgtcca	taaccatgag	7500
tgataacact	gcgcccaact	tacttctgac	aacgatcgga	ggaccgaagg	agctaaccgc	7560
ttttttgcac	aacatggggg	atcatgtaac	tcgccttgat	cggtgggaac	cggagctgaa	7620
tgaagccata	ccaaacgacg	agcgtgacac	cacgatgcct	gtagcaatgg	caacaacgtt	7680
gcgcaaaact	ttactggcgg	aactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	taatagactg	7740
gatggaggcg	gataaagttg	caggaccact	tctgcgctcg	gcccttccgg	ctggctggtt	7800
tattgctgat	aaatctggag	ccggtgagcg	tgggtctcgc	ggatcatttg	cagcactggg	7860
gccagatggg	aagccctccc	gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	7920
ggatgaacga	aatagacaga	tcgctgagat	aggctgcctc	ctgattaagc	attggtaact	7980
gtcagaccaa	gtttactcat	atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	tttaatttaa	8040
aaggatctag	gtgaagatcc	tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	aacgtgagtt	8100
ttcgttccac	tgagcgtcag	accccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	gagatccttt	8160
ttttctgcgc	gtaatctgct	gcttgcaaac	aaaaaaacca	ccgctaccag	cggtggtttg	8220
tttgccggat	caagagctac	caactccttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	8280
gataccaaat	actgttcttc	tagttagacc	gtagttaggc	caccacttca	agaactctgt	8340
agcaccgcct	acatacctcg	ctctgcta	cctgttacc	gtggctgctg	ccagtggcga	8400
taagtctgtg	cttaccgggt	tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	cgcagcggtc	8460
gggctgaacg	gggggttcgt	gcacacagcc	cagcttgagg	cgaacgacct	acaccgaact	8520
gagataccta	cagcgtgagc	tatgagaaag	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcgga	8580
caggatcccg	gtaagcggca	gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	8640
aaacgcctgg	tatctttata	gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	8700
tttgtagatg	tcgtcagggg	ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	cggccttttt	8760
acgggttcctg	gccttttgct	ggccttttgc	tcacatgttc	tttctctgct	tatcccctga	8820
ttctgtggat	aaccgtatta	ccgcctttga	gtgagctgat	accgctcgcc	gcagccgaac	8880
gaccgagcgc	agcagtcag	tgagcgagga	agcgggaag	cgcccaatac	gcaaaccgcc	8940
tctccccgcg	cgttgccgga	ttcattaatg	cagctggcac	gacaggtttc	ccgactggaa	9000
agcgggcagt	gagcgcaacg	caattaatgt	gagttagctc	actcattagg	caccccaggc	9060
tttacacttt	atgcttcggg	ctcgtatgtt	gtgtggaatt	gtgagcggat	aacaatttca	9120
cacaggaaac	agctatgacc	atgattacgc	caagcgcgca	attaaccctc	actaaaggga	9180
acaaaagctg	gagctgc					9197

<210> 4
 <211> 6630
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> vector HZ24

<400> 4

tcaatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta	60
ttggccattg	catacgttgt	atctatatca	taatatgtac	atttatattg	gctcatgtcc	120
aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gactagttat	taatagtaat	caattacggg	180
gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	240
gcctggctga	ccgcccacg	acccccgcc	attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	300
agtaacgcca	atagggaact	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtatttac	ggtaaaactgc	360
ccacttgcca	gtacatcaag	tgtatcatat	gccaaagtcc	ccccctattg	acgtcaatga	420
cggtaaatgg	ccgcctggc	attatgccca	gtacatgacc	ttacgggact	ttcctacttg	480
gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	taccatgggt	atgcggtttt	ggcagtacac	540
caatgggcgt	ggatagcgg	ttgactcacg	gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	600

caatgggagtg	ttgttttggc	acaaaaatca	acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaataaccc	660
cgccccgttg	acgcaaatgg	gcggttaggcg	tgtacggttg	gaggtctata	taagcagagc	720
tcgttttagtg	aaccgtcaga	tcactagaag	ctttatttgcg	gtagtttatc	acagttaaat	780
tgctaacgca	gtcagtgctt	ctgacacaac	agtctcgaac	ttaagctgca	gaagttggtc	840
gtgaggcact	gggcaggtaa	gtatcaaggt	tacaagacag	gtttaaggag	accaatagaa	900
actgggcttg	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	taggcaccta	ttggtcttac	960
tgacatccac	tttgctcttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	acagctctta	1020
aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggctagcatg	ggagtgttaa	aattcaagca	1080
catctttttc	agaagctttg	ttaaatcaag	tggagtatcc	cagatagttt	tcaccttctc	1140
tctgattcca	tggtgcttga	ctctgaattt	cagagcacct	cctgttattc	caaagtgtcc	1200
tttctctctg	gcctggaatg	ccccaaagta	attttgcctt	ggaaaatttg	atgagccact	1260
agatatgagc	ctcttctctt	tcataaggaag	ccccgaata	aacgccaccg	ggcaaggtgt	1320
tacaaatatt	tatgttgata	gacttggtta	ctatccttac	atagattcaa	tcacaggagt	1380
aactgtgaat	ggaggaatcc	cccagaagat	ttccttacaa	gaccatctgg	acaaagctaa	1440
gaaagacatt	acattttata	tgccagtaga	caatttgga	atggctgtta	ttgactggga	1500
agaaatggaa	cccacttggg	caagaaactg	gaaacctaaa	gatgtttaca	agaatagtc	1560
tattgaattg	gttcagcaac	aaaatgtaca	acttagtctc	acagaggcca	ctgagaaagc	1620
aaaacaagaa	tttgaaaagg	caggggaagg	tttcctggta	gagactataa	aattgggaaa	1680
attacttcgg	ccaaatcact	tgtgggggta	ttatcttttt	ccggattgtt	acaacatca	1740
ctataaagaa	cccgtttaca	atggaagttg	cttcaatgta	gaaataaaaa	gaaatgtga	1800
tctcagctgg	ttgtggaatg	aaagcactgc	tctttaccca	tccatttatt	tgaacactca	1860
gcagctctct	gtagctgcta	cactctatgt	gcgcaatcga	gttcgggaag	ccatcagagt	1920
ttccaaaata	cctgatgcaa	aaagtccact	tccggttttt	gcataatccc	gcatagtttt	1980
tactgatcac	gttttgaaat	tcctttctca	agatgaactt	gtgtatacat	ttggcgaaac	2040
tggtgctctg	gggtgcttctg	gaattgtaat	atggggaacc	ctcagataaa	tcgcgaagtat	2100
gaaatccttg	ttgctcctag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
cgtcacacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgtcttgc	caggagcaag	gagtgtgtat	2220
aaggaataaac	tggaattcaa	gtgactatct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgctattca	2280
acttgagaaa	gggtggaagt	tcacagtacg	tggaaaaccg	acacttgaag	acctggagca	2340
attttctgaa	aaattttatt	gcagctgtta	tagcaccttg	agttgtaaag	agaagactga	2400
tgtaaaagac	actgatgctg	ttgatgtgtg	tattgtctgt	ggtgtctgta	tagatgtctt	2460
tctaaaacct	cccatggaga	cagaagaacc	tcaaattttc	tactgaggat	ccatagctaa	2520
cgccccctct	cctccccccc	ccctaaccgt	actggccgaa	gccgcttggg	ataaggcccg	2580
tgtgcgtttg	tctatatgtt	attttccacc	atattgcctg	cttttgccaa	tgtgagggcc	2640
cggaacacct	gccctgtctt	cttgacgagc	atccttaggg	gtctttcccc	tctcgccaaa	2700
ggaatcctga	gtctgttgaa	gtcctggaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ctcttgaaag	2760
caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcggaacc	ccccacctgg	cgacaggtgc	2820
ctctgcggcc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggcggcaca	accccagtcg	2880
cacgttgtga	gttggaatag	tgtggaagaa	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgtattcaac	2940
aaggggctga	aggatgccca	gaaggtacct	cattgtatgg	gatctgatct	ggggcctcgg	3000
tgacacatgct	ttacatgtgt	ttagtgcagg	ttaaaaaac	gtctaggccc	cccgaaaccac	3060
ggggacgtgg	ttttcctttg	aaaaacacga	tgataagctt	gccacaaccc	acagcgcccg	3120
ctgccatcat	ggttcgacca	ttgaactgca	tcgtcgccgt	gtcccaaat	atggggattg	3180
gcaaaaacgt	agacctacct	tggcctccgc	tcaggaacga	gttcaagtac	ttccaaagaa	3240
tgaccacaac	ctcttcagtg	gaaggtaaac	agaatctggg	gattatgggt	aggaaaacct	3300
ggttctccat	tcctgagaag	aatcgacctt	taaaggacag	aattaatata	gttctcagta	3360
gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	attttcttgc	caaaagtgtg	gatgatgcct	3420
taagacttat	tgaacaaccg	gaattggcaa	gtaaagtaga	catggtttgg	atagtcggag	3480
gcagttctgt	ttaccaggaa	gccatgaatc	aaccaggcca	cctcagactc	tttgtgacaa	3540
ggatcatgca	ggaatttgaa	agtgacacgt	ttttcccgag	aattgatattg	gggaaatata	3600
aacttctccc	agaataccca	ggcgtcctct	ctgaggtcca	ggaggaaaaa	ggcatcaagt	3660
ataagtttga	agtctacgag	aagaaagact	aaacgcgtgg	tacctctaga	gtcgaccggg	3720
gcggccgctt	cgagcagaca	tgataagata	cattgatgag	tttggaacaa	ccacaactag	3780
aatgcagtga	aaaaaatgct	ttatttgtga	aatttgtgat	gctattgtct	tatttgtaac	3840
cattataaag	tgcaataaac	aagttaacaa	caacaattgc	attcatttta	tgtttcagggt	3900
tcagggggag	atgtgggagg	ttttttaaag	caagtaaaac	ctctacaaat	gtggtaaaat	3960
cgataaggat	ccgggctggc	gtaatagcga	agaggcccg	accgatcgcc	cttcccaaca	4020
gttgcgagc	ctgaatggcg	aatggacgcg	ccctgtagcg	gcgcattaag	cgcggcgggt	4080
gtggtgggta	cgcgacgcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcc	cgctcctttc	4140
gctttcttcc	cttcttttct	cgccacgttc	gccggctttc	cccgtaagc	tctaaatcgg	4200
gggctccctt	tagggttccg	atttagtgct	ttacggcacc	tcgaccccaa	aaaacttgat	4260
taggggtgat	gttcacgtag	tgggcatcgc	ccctgataga	cggtttttgc	ccctttgacg	4320
ttggagtcca	cgttctttta	tagtggactc	ttgttccaaa	ctggaacaac	actcaaccct	4380


```

atctcgggtct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 4440
aatgagctga ttttaacaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
tcctgatgcg gtattttctc cttacgcacg tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 4560
ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4620
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 4680
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac 4740
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atggttttct 4800
agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg 4980
cggcattttg ccttctgtgt tttgtcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gtctgtctat 5160
gtggcgcggt attatcccggt attgacgcgg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 5220
attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgacagtaag agaattatgc agtctgcca taaccatgag tgataaacact gcggccaact 5340
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 5400
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 5460
agcgtgacac cagcatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaacta ttaactggcg 5520
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 5580
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 5640
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5700
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5760
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
ataacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag 5940
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt tttctgctg gtaatctgct 6000
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttg tttgccggat caagagctac 6060
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgctaata cctgttacca gtgctgctg ccagtggcga taagtctgt cttaccgggt 6240
tggaactcaag acgatagtta ccggataaagg cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttctg 6300
gcacacagcc cagcttgagg cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 6600
ggccttttgc tcacatggct cgacagatct 6630

```

<210> 5
 <211> 1446
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ADN que codifica el precursor de PH20 humana soluble

10 <400> 5

```

atgggagtgct taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatac aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccagtgtgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcttc tgggcctgga atgccccaa gtaattttgt 180
cttgaaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaacact 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg cacttgagaa agcaaaaaca gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780

```

```

ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgcct 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatgggtgct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac 1446

```

<210> 6
 <211> 509
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> proteína precursora de PH20 humana completa 1-509

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(35)
 <223> Secuencia señal

15 <400> 6

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

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

<210> 7

<211> 482

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> precursora de PH20 humana soluble, residuos de aminoácidos 1-482

10

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)...(35)

<223> Secuencia señal

15

<400> 7

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

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

<210> 8

<211> 186

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> proteína dihidrofolato reductasa de ratón

10

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 1449

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> secuencia de ARNm de PH20 de células 3D35M (contiene c por a en la base 1131)

<400> 9

```

atgggagtgct taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatac aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
cttggaataat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccca 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
taccatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcaactataa aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tgggttggtg atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttgcgga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag tcaagtgttt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaat 1440
ttctactga 1449

```

<210> 10

15 <211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> CTLA4

<300>

<308> GenBank: AAL07473.1

<309> 2001-09-26

25

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 123
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> aptámero de unión a CTLA-4 M9a-1

10 <400> 11
 gggggaattc taatacgact cactataggg agagaggaag agggataggc cgcccagagta 60
 caaacgtact cgctgtttg cccaaccgac ataaccaga ggtcgatagt acyggatccc 120
 ccc 123

15 <210> 12
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> aptámero de unión a CTLA-4 M9a-4

<400> 12
 cagccaaagg atatcaagc ggcacgccat aacacaacac 40

25 <210> 13
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> aptámero de unión a CTLA-4 M9a-5

<400> 13
 caccggaagg gctacactcc tatatcccct gccagcccg c 41

35 <210> 14
 <211> 40
 <212> ADN

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> aptámero de unión a CTLA-4 M9a-8	
5	<400> 14	
	accacagcct ttatccaagc ggggtgagccc cgtgaacaat	40
	<210> 15	
10	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> aptámero de unión a CTLA-4 M9a-9	
	<400> 15	
	ccgacgtgcc gcaactcaa ccctgcacaa ccaatccgcc	40
20	<210> 16	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> aptámero de unión a CTLA-4 M9a-14	
	<400> 16	
30	caacgaaagg tgctccacta agaatggaac ttctgcgatc	40
	<210> 17	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> aptámero de unión a CTLA-4 M9a-15	
	<400> 17	
40	gtgctcaatc acgaaccgc tcgactctt ctccaagcc	40
	<210> 18	
	<211> 40	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> aptámero de unión a CTLA-4 M9a-18	
50	<400> 18	
	tgctccaaca ctcaactcgg aaccacctgc attccgctct	40
	<210> 19	
	<211> 10	
55	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> c-myc	
60	<400> 19	
	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu	
	1 5 10	

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> etiqueta FLAG

<400> 20

Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys
1				5			

10

<210> 21
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <223> dominio variable de cadena pesada (VH) de Ipilimumab

20

<400> 21

cagggtgcagc	tggtggagtc	tggggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agctatacta	tgcactgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtgacattt	atatcatatg	atggaaacaa	taaatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaataga	acagcctgag	agctgaggac	acggctatat	attactgtgc	gaggaccggc	300
tggctggggc	cctttgacta	ctggggccag	ggaaccctgg	tcaccgtctc	ctcag	355

<210> 22
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<220>
 <223> dominio variable de cadena pesada (VH) de Ipilimumab

30

<400> 22

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

35

<210> 23
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40

<220>
 <223> dominio variable de cadena pesada (VH) de Ipilimumab

<400> 23


```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttggc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatocca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 300
caagggacca agtggaat caaac                                     325

```

<210> 24
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> dominio variable de cadena ligera (VH) de Ipilimumab

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR1 de VH de Ipilimumab

<400> 25

	Ser	Tyr	Thr	Met	His
	1				5

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR2 de VH de Ipilimumab

<400> 26

Phe	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Asn	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR3 de VH de Ipilimumab

<400> 27

ES 2 727 137 T3

```

                    Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
                      1           5

5  <210> 28
   <211> 12
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

   <220>
   <223> CDR1 de VL de Ipilimumab
10  <400> 28
      Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser Tyr Leu Ala
        1           5           10

15  <210> 29
   <211> 7
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

   <220>
20  <223> CDR2 de VL de Ipilimumab

   <400> 29
      Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr
        1           5

25  <210> 30
   <211> 9
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

30  <220>
   <223> CDR3 de VL de Ipilimumab

   <400> 30
      Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
        1           5

35  <210> 31
   <211> 6
   <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

40  <220>
   <223> Etiqueta His

   <400> 31
      His His His His His His
        1           5

45  <210> 32
   <211> 9
   <212> PRT
50  <213> Secuencia Artificial

   <220>
   <223> Etiqueta HA

55  <400> 32
      Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
        1           5

   <210> 33
   <211> 500

```

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> Dominio variable de cadena pesada de Tremelimumab (VH)

<400> 33

```
ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccttc 60
agtagctatg gcatgcactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 120
gttatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc 180
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag 240
gacacggctg tgtattactg tgcgagagat ccgaggggag ctacccttta ctactactac 300
tacgggatgg acgtctgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 360
ggcccatcgg tcttccccct ggccgacctg tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 420
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtg cgggtgctgt gaactcaggc 480
gctctgacca gcggcgtgca                                     500
```

10 <210> 34
<211> 167
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

15 <223> Dominio variable de cadena pesada de Tremelimumab (VH)

<400> 34

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

20 <210> 35
<211> 417
<212> ADN
25 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Dominio variable de cadena ligera de Tremelimumab (VH)

30 <400> 35

```
ccatcctccc tgtctgcatc tgtaggagac agagtcacca tcacttgccg ggcaagtcag 60
agcattaaca gctatttaga ttggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc taaactcctg 120
atctatgctg catccagttt gcaaagtggg gtcccatcaa gggtcagtgag cagtggatct 180
gggacagatt tcactctcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac 240
tgtcaacagt attacagtac tccattcact ttcggccctg ggaccaaagt ggaaatcaaa 300
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct 360
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgtcgaat aacttctatc ccagagaggc caaagta 417
```

<210> 36

<211> 139
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <220>
<223> Dominio variable de cadena ligera de Tremelimumab (VH)

<400> 36

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

10 <210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Conector (-G4S-)1

<400> 37

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Conector (-G4S-)2

30 <400> 38

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10

<210> 39
<211> 15
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Conector (Gly4Ser)3

40 <400> 39

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 40
45 <211> 20
<212> PRT

ES 2 727 137 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector (-G4S-)4
 5
 <400> 40
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20
 10
 <210> 41
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15
 <223> Conector (-G4S-)5
 <400> 41
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25
 20
 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> VSV-G
 <400> 42
 Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 1 5 10
 30
 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 35
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> HSV
 40
 <400> 43
 Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
 1 5 10
 45
 <210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> V5
 50
 <400> 44
 Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 1 5 10
 55
 <210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial Poli Arg

<220>
 <223> Etiqueta Poli Arg

<400> 45

5 Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Strep-etiqueta-II

15 <400> 46

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5

<210> 47
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Etiqueta epitópica S

25 <400> 47

Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> 3x Etiqueta FLAG

<400> 48

Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 1 5 10 15
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 20

40 <210> 49
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Etiqueta HAT

<400> 49

Lys Asp His Leu Ile His Asn Val His Lys Glu Phe His Ala His Ala
 1 5 10 15
 His Asn Lys

50 <210> 50
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Etiqueta SBP

ES 2 727 137 T3

<400> 50

Met	Asp	Glu	Lys	Thr	Thr	Gly	Trp	Arg	Gly	Gly	His	Val	Val	Glu	Gly
1				5				10			15				
Leu	Ala	Gly	Glu	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Arg	Leu	Glu	His	His	Pro
		20					25					30			
Gln	Gly	Gln	Arg	Glu	Pro										
		35													

210> 51

5 <211> 2116

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> HAS1

<400> 51

```

cggagagaag agagagcccg gccagaccca ctgcatgag acagcaggac gcgcccgaagc 60
ccactcctgc agcctgccgc tgcctcggcc tggcccgag ggtgctgacc atcgccctcg 120
ccctgctcat cctgggcctc atgacctggg cctacgccgc cggggtgccg ctggcctccg 180
atcgctacgg cctcctggcc ttccggcctc acggggcctt cctttcagcg cacctggtgg 240
cgcagagcct cttcgcgtac ctggagcacc ggcgggtggc ggcggcgccg cgggggcccg 300
tggatgcagc caccgcgcgc agtgtggcgc tgacctctc cgcctaccag gaggaccccg 360
cgtacctgcg ccagtgcctg gcgtccgccc gcgccctgct gtacccgcgc gcggggctgc 420
gcgtcctcat ggtggtgat ggcaaccgcg ccgaggacct ctacatggtc gacatgttcc 480
gcgaggtctt cgctgacgag gaccccgcca cgtacgtgtg ggacggcaac taccaccagc 540
cctgggaacc cgcggcgccg ggcgcgggtg gcgccggagc ctatcgggag gtggaggcgg 600
aggatcctgg cgggctggca gtggaggcgc tggtaggac tcgcagggtc gtgtgcgtgg 660
cgcagcgctg gggcggaag cgcgaggtca tgtacacagc cttcaaggcg ctcgagatt 720
cggtaggacta cgtgcaggct tgtgactcgg acacaagggt ggaccccatg gcaactgctg 780
agctcgtgcg ggtactggac gaggaccccc gggtaggggc tggtagggg gacgtgcgga 840
tccttaaccc tctggaactc tgggtcagct tcctaagcag cctgcgatac tggtagacct 900
tcaatgtgga cggggcttgt cagagctact tccactgtgt atcctgcac agcggctctc 960
taggcctata taggaataac ctcttgacgc agtttcttga ggcctggtac aaccagaagt 1020
tcctgggtac ccactgtact tttggggatg accggcacct caccaaccgc atgctcagca 1080
tgggttatgc tacciaagtac acctccaggt cccgctgcta ctacagagac ccctcgtcct 1140
tcctgcggtg gctgagccag cagacacgct ggtccaagtc gtaactccgt gagtggctgt 1200
acaacgcgct ctggtggcac cggcaccatg cgtggatgac ctacgaggcg gtggtctccg 1260
gcctgttccc cttcttcgtg gcggccactg tgcctgcgtc gttctacgcg ggccgccctt 1320
gggcgctgct gtgggtgctg ctgtgcgtgc agggcggtgg actggccaag gcggccttcg 1380
cggcctggct gcggggctgc ctgcgcctgg tgcctctgtc gctctacgcg cccctctaca 1440
tgtgtggcct cctgcctgcc aagttcctgg cgctagtac catgaaccag agtggctggg 1500
gcacctcggg cggcggaag ctggccgcta actacgtccc tctgctgcc ctggcgctct 1560
gggcgctgct gctgcttggg gccctggtcc gcagcgtagc acacgaggcc agggccgact 1620
ggagcggccc ttcccgcgca gccgaggcct accacttggc cgcgggggccc ggcgcctacg 1680
tgggctactg ggtggccatg ttgacgctgt actgggtggg cgtgcggagg ctttgccggc 1740
ggcggaccgg gggctaccgc gtccagggtg gagtccagcc acgcggatgc cgcctcaagg 1800
gtcttcaggg gagggcagag gagagctgct gggccccgag ccacgaactt gctgggtggg 1860
tctctgggcc tcagtttccc tcctctgcaa aacgaggggg tcagcccaag attcttcagt 1920
ctggactata ttgggactgg gacttctggg tctccaggga gggatattat tggtcagggt 1980
gtgggatctg aggagtggag ggaaagggtc ctgctttctc ctcgtttcta tttaatctcc 2040
atttctactg tgtgatcagg atgtaataaa gaattttatt tattttcaaa aaaaaaaaaa 2100
aaaaaaaaa aaaaaa 2116

```

15 <210> 52

<211> 3275

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <220>

<223> HAS2

<400> 52

gaagtcaaga cgtctggaaa gaattaccca gtcctggcct cgagcagccc attgaaccag 60
agacttgaaa cagccccagc caaagacttt tctcccaatt ctgcgcttcc tgggttctgc 120
tgagtcttcc acaggctttt tttttttttt tttttttttt taagacgaaa aagagatttt 180
ctgttatcgg gggcagaaaag actgaagccc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagaaaagaa 240
aagaaaaaag aaaagttaat ttatttttaa agcataattt ttttaagaat tagactgaag 300
tgcaacggaa acataaagag aatattagtg aaattatttt ttaaagtggg gaagaatcaa 360
acatttaaga ctcccctatc ctttttaaat gttgttttta aatttcttat tttttttggc 420
cggctcgtctc aaattcatct gatctcttat tacctcaatt ttggaaactg cccgccaccg 480
accctccggg acccacacaga caggctgagg acgactttat gaccaagagc tgaacaagat 540
gcattgtgag aggtttctat gtatcctgag aataattgga accacactct ttggagtctc 600
tctcctcctt ggaatcacag ctgcttatat tgttggctac cagtttatcc aaacggataa 660
ttactatttc tcttttgagc tgtatggtgc ctttttgga tcacacctca tcatccaaag 720
cctgtttggc tttttggagc accgaaaaat gaaaaaatcc ctagaacccc ccataaagt 780
gaacaaaaca gttgcctttt gcctcgtctc ctatcaagaa gatccagact acttaaggaa 840
atggtttgcaa tctgtgaaaa ggctaaccct cctgggatt aaagtgtca tgggtcagaa 900
tgggaactca gaagatgacc ttacatgat ggacatcttc agtgaagtca tgggcagaga 960
caaatcagcc acttatatct ggaagaacaa cttccacgaa aggggtcccg gtgagacaga 1020
tgagtcacat aaagaaagct cgcaacacgt aacgcaattg gtcttgcca acaaaagtat 1080
ctgcatcatg caaaaatggg gtggaaaaag agaagtcagc tacacagcct tcagagcact 1140
gggacgaagt gtggattatg tacaggtttg tgattcagac actatgcttg accgacctc 1200
atctgtggag atggtaaaag ttttagaaga agatcccatg gttggagggtg ttgggggaga 1260
tgtccagatt ttaacaagt acgattcctg gatctcattc ctgagcagtg taagatattg 1320
gatggctttt aatatagaaa gggcctgtca gtcttatttt gggtgtgttc agtgcatatg 1380
tggacctctg ggaatgtaca gaaactcctt gttgcatgag tttgtggaag attggtacaa 1440
tcaagaattt atgggcaacc aatgtagctt tgggtgatgac aggcacatca cgaaccgggt 1500
gctgagcctg ggctatgcaa caaatacac agctcgtatc aagtgcctta ctgaaacacc 1560
tatagaatat ctgagatggc taaaccagca gaccctgttg agcaagtcct acttccgaga 1620
atggctgtac aatgcaatgt ggtttcacaa acatcacttg tggatgacct acgaagcgat 1680
tatcactgga ttctttcctt tctttctcat tgccacagta atccagctct tctaccgggg 1740
taaaatttgg aacattctcc tcttctgttt aactgtccag ctagtaggtc tcataaaatc 1800
atcttttgcc agctgcctta gaggaatat cgtcatggtc ttcatgtctc tctactcagt 1860
gttatacatg tgcagtttac ttcccgcga gatgtttgca attgcaacaa taaacaaagc 1920
tgggtggggc acatcaggaa ggaaaacat tgtgttaaat ttcataggac tcattccagt 1980
atcagctttg ttacaatcc tctgggttg tgtgatttt accatttata aggagtctaa 2040
aaggcattt ttcagaatcca aacagacagt tctaattgtt ggaacgttg cctatgcatg 2100
ctattgggtc atgcttttga cgctgtatgt agttctcatc aataagtgtg gcaggcggaa 2160
gaagggacaa caatatgaca tgggtgcttg tgtatgatct tccatgtttt gacgtttgca 2220
gtcacacaca acaccttagt tctcttaggg gctgtacagt attgtggcat cagataatgc 2280
caccaaagga gacatatcac tgctgctggg acttgaacaa agacatttat atgggtttat 2340
tttcattctg ccaaagttaa acaatacatc aacaagaaga aactcagatt taacctgtta 2400
tttctatgaa aatgggatga attctttgtt tatgcacttt ttcttactg tgcacccggc 2460
tgaaagtgtt ttgcccataa tacctcacta gccatgcttt atgtgggtta tcatggaaga 2520
aaaggatttt ggaaactcaa ggaaggttc tttcaaccta tacaacctaa cttatggact 2580
gttttgatg atgataattt ttttttttta ggaaggattt tcttttttaac ttaccaaat 2640
gaaatgccaa aggaagtttt aaaggccgtt ggctgtgctg tattttgata taattgtact 2700
gtgtttttta attttgatg ccaatcttaa agacaaattt tgcataattc ctattttact 2760
tttctgccaa aataaacctg ttcttctctt tttaaaataa aataagttct taaaaattt 2820
atacttaaaa aatcctgccc aaaatgtgaa gcttggttga ctgatgttca tgatagaaag 2880
aataaaaatgt ttctctctct caccctttta aaattgaata gtttatttct gtgaaagaag 2940
tatttaaaact ttcaatattt taactttttg tttttatttc ttttagaaaa ggccaatata 3000
cctatcacac tttggaagta aaaatacaca ctttctgtgt tacctaaaaa aaaaatcgtt 3060
gaaaatcaag gccaaaggta gtgcaatttt ttcattaaaga tttaaaaaaa agggaatgat 3120
agtctttgaa agaaaacagt aggcattccag cactggacaa aacatgggta tcaaagatga 3180
ataatctttg gagattctgg cagtgttttc ccagaacaag tcaagtggaa agtgagaaaa 3240
ttatctgtat aattttggac acatacaatg cagtt 3275

<210> 53
<211> 339
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> región variable de la cadena pesada de Nivolumab

<400> 53

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
gactgtaaag cgtctggaat caccttcagt aactctggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atttggatg atggaagtaa aagatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gacaaacgac 300
gactactggg gccaggaac cctggtcacc gtctcctca 339

<210> 54
<211> 113
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> región variable de la cadena pesada de Nivolumab

<400> 54
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser

<210> 55
<211> 321
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> región variable de la cadena ligera de Nivolumab

<400> 55
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agttacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag agtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 56
<211> 107
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> región variable de la cadena ligera de Nivolumab

<400> 56
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 57
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 5
 <220>
 <223> CDR1 de VH de Nivolumab
 <400> 57
 Asn Ser Gly Met His
 1 5
 10
 <210> 58
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 15
 <220>
 <223> CDR2 de VH de Nivolumab
 <400> 58
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 59
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 25
 <220>
 <223> CDR3 de VH de Nivolumab
 30
 <400> 59
 Asn Asp Asp Tyr
 1
 <210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 35
 <220>
 <223> CDR1 de VL de Nivolumab
 40
 <400> 60
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 45
 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 50
 <220>
 <223> CDR2 de VL de Nivolumab
 <400> 61
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 55
 <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>

<223> CDR3 de VL de Nivolumab

<400> 62

	Gln	Gln	Ser	Ser	Asn	Trp	Pro	Arg	Thr
5	1				5				

<210> 63

<211> 1340

<212> ADN

10 <213> Desconocido

<220>

<223> cadena pesada completa de MK-3475

15 <400> 63

```

aggtgcagct ggtgcagtc gccgtggagg tgaagaagcc tggcgccctcc gtcaaggtgt 60
cctgtaaggc ctccggctac accttcacca actactacat gtactgggtg cggcaggccc 120
caggccaggg actggagtgg atgggcgggc tcaacccttc caacggcggc accaacttca 180
acgagaagtt caagaaccgg gtgacctga ccaccgactc ctccaccaca accgcctaca 240
tggaactgaa gtccctgcag ttcgacgaca ccgccgtgta ctactgcgcc aggcgggact 300
accggttcga catgggcttc gactactggg gccagggcac caccgtgacc gtgtcctccg 360
ctagcaccaa gggcccttcc gtgttccctc tggccccttg ctcccgggtc acctccgagt 420
ccaccgccgc tctgggctgt ctggtgaagg actacttccc tgagcctgtg accgtgagct 480
ggaactctgg cgccctgacc tccggcgctg acaccttccc tggcggtgtg cagtcctccg 540
gcctgtactc cctgtcctcc gtggtgaccg tgccttcctc ctccctgggc accaagacct 600
acacctgcaa cgtggaccac aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagtcca 660
agtagcggccc tccttgccct cctgcccctg cccctgagtt cctgggcgga cctccgtgt 720
tcctgttccc tcctaagcct aaggacaccc tgatgatctc ccggaccctc gaggtgacct 780
gcgtggtggt ggacgtgtcc caggaagatc ctgaggtcca gttcaattgg tacgtggatg 840
gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ctggggagga acagtccaac tccacctacc 900
gggtggtgtc tgtgtgacc gtgtgtgacc aggactggct gaacggcaag gaatacaagt 960
gcaaggtcag caacaagggc ctgccctcct ccatcgagaa aaccatctcc aaggccaagg 1020
gccagcctcg cgagcctcag gtgtacaccc tgcctcctag ccaggaagag atgaccaaga 1080
atcaggtgtc cctgacatgc ctggtgaagg gcttctaccc ttccgatatc gccgtggagt 1140
gggagagcaa cggccagcca gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg ctggactccg 1200
acggctcctt cttcctgtac tccaggctga ccgtggacaa gtcccgggtg caggaaggca 1260
acgtcttttc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagtccc 1320
tgtccctgtc tctgggcaag                                     1340

```

<210> 64

<211> 447

20 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> cadena pesada completa de MK-3475

25

<400> 64

ES 2 727 137 T3

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

<210> 65
 <211> 334
 <212> ADN
 <213> Desconocido

<220>
 <223> cadena ligera completa de MK-3475

<400> 65

```

cgagatcgtg ctgaccagct cccctgccac cctgtccctg agccctggcg agcgggctac 60
cctgagctgc agagcctcca agggcgtgtc cacctccggc tactcctacc tgcactggta 120
tcagcagaag ccaggccagg cccctcggct gctgatctac ctggcctcct acctggagtc 180
cggcgtgcct gcccggttct cgggctccgg aagcggcacc gacttcaccc tgaccatctc 240
ctccctggag cctgaggact tcgccgtgta ctactgccag cactcccggg acctgcctct 300
gacctttggc ggcggaacaa aggtggagat caag                                     334

```

<210> 66
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> cadena ligera completa de MK-3475

<400> 66

```

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

```

<210> 67
 <211> 361
 <212> ADN
 <213> Desconocido

<220>
 <223> dominio variable de cadena pesada de MK-3475

<400> 67

```

ccagggtgcag ctggtgcagt cgggcgtgga ggtgaagaag cctggcgcct ccgtcaaggt 60
gtcctgcaag gcctccggct acaccttcac caactactac atgtactggg tgcggcaggc 120
tcccggccag ggactggagt ggatggcgcg catcaaccct tccaacggcg gcaccaactt 180
caacgagaag ttcaagaacc ggggtgacct gaccaccgac tcctccacca ccaccgccta 240
catggagctg aagtcctgct agttcgacga caccgccgtg tactactgcy ccaggcggga 300
ctaccgggttc gacatgggct tcgactactg gggccagggc accaccgtga ccgtgtcctc 360
c

```

<210> 68
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>

<223> dominio variable de cadena pesada de MK-3475

<400> 68

```

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

```

5

<210> 69

<211> 333

<212> ADN

<213> Desconocido

10

<220>

<223> dominio variable de cadena ligera de MK-3475

<400> 69

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttatct gcactgggtat 120
caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcactatc ttgcatccta cctagaatct 180
ggcgtcccag ccaggttcag tggtagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc 240
agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc acagcaggga ccttccgctc 300
acgttcggcg gagggaccaa agtggagatc aaa 333

```

15

<210> 70

<211> 111

<212> PRT

<213> Desconocido

20

<220>

<223> dominio variable de cadena ligera de MK-3475

25 <400> 70

```

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

```

30 <210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Desconocido

35

<220>

<223> CDR1 de VH de MK-3475

ES 2 727 137 T3

<400> 71
Asn Tyr Tyr Met Tyr
1 5

5 <210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> Desconocido

10 <220>
<223> CDR2 de VH de MK-3475

<400> 72
Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asn

15 <210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

20 <220>
<223> CDR3 de VH de MK-3475

<400> 73
Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> Desconocido

30 <220>
<223> CDR1 de VL de MK-3475

<400> 74
Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
1 5 10 15

35 <210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> CDR2 de VL de MK-3475 Desconocido

40 <220>
<223> CDR2 de VL de MK-3475

45 <400> 75
Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
1 5

50 <210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> Desconocido

55 <220>
<223> CDR3 de VL de MK-3475

<400> 76
Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 77
 <211> 1401
 <212> ADN
 <213> Desconocido

5

<220>
 <223> Cadena pesada completa de Pidilizumab

<400> 77

```

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccactcccag 60
gtgcagctgg tgcaatctgg gtctgagctt aagaagcctg gggcctcagt gaagatctcc 120
tgcaaggctt ctggatatac tttcaciaaac tatggaatga actgggtgag acaggcccct 180
ggacaagggc ttcagtggat gggatggata aacaccgaca gtggagagtc aacatatgct 240
gaagagttca agggacggtt tgtcttctcc ttggacacct ctgtcaacac ggcatactctg 300
cagatcacca gcctcacggc tgaggacact ggcattgtatt tctgtgtgag agtcggctac 360
gatgcttttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcgagcgc ctccaccaag 420
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctg gaactcaggc 540
gccctgacca gggcggtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctt catctgcaac 660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 720
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 780
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900
gtggaggtgc ataataccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg 960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tccctgtctc cgggtaaaatg a 1401
    
```

10

<210> 78
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Desconocido

15

<220>
 <223> Cadena pesada completa de Pidilizumab

20

<400> 78


```

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

```

<210> 79

5 <211> 708

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

10 <223> Cadena ligera completa de Pidilizumab

<400> 79

```

atggacatga ggggtcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
aaatgtgaaa ttgtgttgac gcagctctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgcagtgc caggtcaagt gtaagttaca tgcactggtt ccagcagaaa 180
ccagggaag cccctaagct ctggatctat aggacatcca acctggcttc tgggggtcca 240
tctagattca gcggcagtgg atctgggaca tcttactgtc tcaccatcaa cagcctgcag 300
cctgaagatt ttgcaactta ctattgccag caaaggagta gtttccact cactgtcgcc 360
ggagggacca agctggagat caaacgtact gtggctgcac catctgtctt catcttccc 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 708

```

<210> 80

5 <211> 235

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

10 <223> Cadena ligera completa de Pidilizumab

<400> 80

```

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

```

15

<210> 81

<211> 421

<212> ADN

<213> Desconocido

20

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada de Pidilizumab

<400> 81

ES 2 727 137 T3

```

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccactcccag 60
gtgcagctgg tgcaatctgg gtctgagctt aagaagcctg gggcctcagt gaagatctcc 120
tgcaaggctt ctggatatac tttcacaaac tatggaatga actgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttcagtggat gggatggata aacaccgaca gtggagagtc aacatatgct 240
gaagagttca agggacgggt tgtcttctcc ttggacacct ctgtcaacac ggcatactcg 300
cagatcacca gcctcacggc tgaggacact ggcattgtatt tctgtgtgag agtcgggtac 360
gatgctttgg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctcagg tgagtggatc 420
c

```

<210> 82

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada de Pidilizumab

10

<400> 82

```

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

```

<210> 83

15 <211> 384

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> dominio variable de la cadena ligera de Pidilizumab

<400> 83

```

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
aaatgtgaaa ttgtgttgac gcagctctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgcagtgc caggtaagt gtaagttaca tgcactggtt ccagcagaaa 180
ccagggaag cccctaagct ctggatctat aggacatcca acctggcttc tggggtccca 240
tctagattca gcggcagtgg atctgggaca tcttactgtc tcaccatcaa cagcctgcag 300
cctgaagatt ttgcaactta ctattgccag caaaggagta gtttccact cacgttcggc 360
ggagggacca agctggagat caaa

```

25 <210> 84

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> dominio variable de la cadena ligera de Pidilizumab

<400> 84

ES 2 727 137 T3

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

<210> 85

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR1 de VH de Pidilizumab

10

<400> 85

Asn Tyr Gly Met Asn

1

5

<210> 86

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> CDR2 de VH de Pidilizumab

<400> 86

Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys

1

5

10

15

Gly

25 <210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> CDR3 de VH de Pidilizumab

<400> 87

Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr

1

5

35

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> CDR1 de VL de Pidilizumab

<400> 88

Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1

5

10

45

<210> 89

<211> 7

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> CDR2 de VL de Pidilizumab

<400> 89

	Arg	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
	1				5		

10 <210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> CDR3 de VL de Pidilizumab

<400> 90

	Gln	Gln	Arg	Ser	Ser	Phe	Pro	Leu	Thr
	1				5				

20 <210> 91
<211> 369
<212> ADN
<213> Desconocido

25 <220>
<223> región variable de la cadena pesada de BMS-936559

<400> 91

	cagg	tcca	gcag	tc	tggt	gcag	tc	tg	ggg	gcag	tc	tg	gaaga	agc	ctgg	gcct	c	gg	gaag	gtc	60
	tcct	gca	aaga	ctt	ctg	gaga	cac	ctt	cag	c	ac	ctat	gcta	tcag	ctg	ggg	gcg	acag	gcc	120	
	cctg	gaca	aag	gg	ctt	gagt	gat	ggg	agg	at	cat	cccta	tatt	tgg	taa	agc	acac	tac	180		
30	gcac	aga	agt	tcc	agg	gcag	agt	cac	gatt	acc	gcg	gac	aat	ccac	gag	cac	agc	ctac	240		
	atgg	agct	ga	gcag	cct	gag	at	ctg	agg	ac	gcc	gtg	at	ttt	tgt	gc	gaga	aag	ttt	300	
	cact	ttg	ttt	cg	ggg	agcc	ctt	cgt	atg	gac	gtc	tg	g	cca	agg	gac	cac	ggt	cacc	360	
	gtct	cct	ca																369		

<210> 92
<211> 123
35 <212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> región variable de la cadena pesada de BMS-936559

40 <400> 92

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

<210> 93

<211> 318
<212> ADN
<213> Desconocido

5 <220>
<223> región variable de la cadena ligera de BMS-936559

<400> 93
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgacgtt cggccaaggg 300
accaaggtgg aaatcaaa 318

10 <210> 94
<211> 106
<212> PRT
<213> Desconocido

15 <220>
<223> región variable de la cadena ligera de BMS-936559

<400> 94
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 95
<211> 6
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CDR1 de VH de BMS-936559

30 <400> 95
Thr Tyr Ala Ile Ser Trp
1 5

<210> 96
35 <211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
40 <223> CDR2 de VH de BMS-936559

<400> 96
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

45 <210> 97
<211> 14

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
5 <223> CDR3 de VH de BMS-936559

<400> 97

	Lys	Phe	His	Phe	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Phe	Gly	Met	Asp	Val
	1				5					10				

10 <210> 98
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

15 <220>
<223> CDR1 de VL de BMS-936559

<400> 98

	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
	1				5					10	

20 <210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido

25 <220>
<223> CDR2 de VL de BMS-936559

<400> 99

	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr
	1				5		

30 <210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Desconocido

35 <220>
<223> CDR3 de VL de BMS-936559

40 <400> 100

	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Thr
	1				5			

45 <210> 101
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> región variable de la cadena pesada de MEDI4736

50 <400> 101

gaggtgcagc	tggtcgagtc	tggcggcgga	ctggtgaagc	ctggcggctc	cctgagactg	60
tcttgcgccg	ccagtggctt	tacattcagt	acctactcca	tgaactgggt	ccgccaggca	120
ccaggcaagg	gcctggaatg	ggtgtcctcc	atctcatcca	gtggcgacta	catctactac	180
gccgactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tcccgggaca	acgccaagaa	ctccctgtat	240
ctgcagatga	actccctgag	agccgaggac	accgccgtgt	actactgcgc	cagggacctg	300
gtgacatcca	tggtggcctt	cgactactgg	ggtcagggca	ctctcgtcac	agtgtcctct	360

55 <210> 102
<211> 120
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> región variable de la cadena pesada de MEDI4736

5

<400> 102

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

10

<210> 103

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<220>

<223> región variable de la cadena ligera de MEDI4736

<400> 103

tcttacgagc	tgaccacagcc	tccttccgtg	tccgtgtctc	caggacagac	ggccagaatc	60
acctgttccg	gcgacgccct	gcctcagaaa	tacgtgttct	ggtatcagca	gaagtccggc	120
caggccctcg	tgctggtgat	ctacgaggac	tccaagcggc	cttccggcat	ccctgagcgg	180
ttctccggct	cctcttccgg	caccatggcc	accctgacca	tctctggcgc	ccaggtggag	240
gacgaggccg	actactactg	ctactccacc	gacagatccg	gcaaccacag	agtgtttggt	300
gggggtacta	agctgaccgt	gctg				324

20

<210> 104

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<220>

<223> región variable de la cadena ligera de MEDI4736

<400> 104

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

30

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

35

<213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR1 de VH de MEDI4736

5 <400> 105
 Thr Tyr Ser Met Asn
 1 5

<210> 106
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR2 de VH de MEDI4736

15 <400> 106
 Ser Ile Ser Ser Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 107
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 25 <223> CDR3 de VH de MEDI4736

<400> 107
 Asp Leu Val Thr Ser Met Val Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <220>
 <223> CDR1 de VL de MEDI4736 VL CDR1

<400> 108
 Ser Gly Asp Ala Leu Pro Gln Lys Tyr Val Phe
 1 5 10

40 <210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <223> CDR2 de VL de MEDI4736 VL CDR2

<400> 109
 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

50 <210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR3 de VL de MEDI4736

<400> 110

Tyr Ser Thr Asp Arg Ser Gly Asn His Arg Val
1 5 10

<210> 111

5 <211> 1446

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<220>

10 <223> ADN que codifica el "precursor" de rHuPH20 soluble

<400> 111

```
atgggagtgct taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatac aagtggagta 60
ttccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
cttggaataat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccca 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccacttt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttgggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttcoggatt gttacaacca tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tgggttggtg atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttgccga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgtct 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac 1446
```

15 <210> 112

<211> 433

<212> PRT

<213> Desconocido

20 <220>

<223> cadena pesada completa MPDL3280A

<400> 112

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

ES 2 727 137 T3

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

<210> 113
 <211> 212
 5 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cadena ligera completa de MPDL3280A

10 <400> 113

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

ES 2 727 137 T3

```

          100          105          110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
          115          120          125
Ala Ser Trp Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
          130          135          140
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
145          150          155          160
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
          165          170          175
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
          180          185          190
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
          195          200          205
Arg Gly Glu Cys
          210

```

<210> 114
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> región variable de la cadena pesada de MPDL3280A

```

<400> 114
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
          20          25          30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
Leu Val Thr Val Ser Ala
          115

```

<210> 115
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> región variable de la cadena ligera de MPDL3280A

```

<400> 115
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
          20          25          30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
          85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105

```

<210> 116
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 5 <223> CDR1 de VH de MPDL3280A VH CDR1

 <400> 116
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
 1 5 10

 10 <210> 117
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 15 <220>
 <223> CDR2 de VH de MPDL3280A VH CDR2

 <400> 117
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

 20 <210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 25 <220>
 <223> CDR3 de VH de MPDL3280A

 <400> 118
 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5

 30 <210> 119
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> CDR1 de LH de MPDL3280A

 40 <400> 119
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

 <210> 120
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> CDR2 de LH de MPDL3280A

 50 <400> 120
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

 <210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>

ES 2 727 137 T3

<223> CDR3 de LH de MPDL3280A

<400> 121

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

5

<210> 122

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> PH20 madura

<400> 122

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

15

ES 2 727 137 T3

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

<210> 123
<211> 447
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PH20 36-482

<400> 123

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

ES 2 727 137 T3

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

<210> 124
<211> 446
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PH20 36-481

<400> 124

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

ES 2 727 137 T3

```

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

```

<210> 125
 <211> 445
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-480

10 <400> 125

```

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

```

ES 2 727 137 T3

```

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

```

<210> 126
 <211> 444
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-479

10 <400> 126

```

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

```

ES 2 727 137 T3

				85					90					95		
Thr	Phe	Tyr	Met	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val	Ile	Asp	Trp	
			100					105					110			
Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	
			115					120					125			
Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Val	Gln	Leu	
			130				135					140				
Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe	Glu	Lys	Ala	
					150					155					160	
Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu	Arg	
			165						170						175	
Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys	Tyr	Asn	His	
			180					185					190			
His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn	Val	Glu	Ile	
			195				200					205				
Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser	Thr	Ala	Leu	
						215					220					
Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val	Ala	Ala	Thr	
					230					235					240	
Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val	Ser	Lys	Ile	
				245					250					255		
Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr	Arg	Ile	Val	
			260					265					270			
Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu	Leu	Val	Tyr	
			275				280					285				
Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Val	Ile	Trp	
						295					300					
Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Asp	
					310					315					320	
Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn	Val	Thr	Leu	
				325					330					335		
Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln	Gly	Val	Cys	
			340					345					350			
Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu	Asn	Pro	Asp	
			355				360					365				
Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr	Val	Arg	Gly	
						375					380					
Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys	Phe	Tyr	Cys	
					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				</				

<210> 127
<211> 443
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PH20 36-478

<400> 127

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

ES 2 727 137 T3

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

<210> 128

<211> 442

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-477

10

<400> 128

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

ES 2 727 137 T3

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

<210> 129
<211> 432
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PH20 madura 36-467

<400> 129

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

<210> 130
 <211> 448
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 madura 36-483

10 <400> 130

ES 2 727 137 T3

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

<210> 131

<211> **464**

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 madura 36-499

10

<400> 131

ES 2 727 137 T3

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

<210> 132
 5 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-497

<400> 132

ES 2 727 137 T3

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

<210> 133
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-495

<400> 133

ES 2 727 137 T3

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

<210> 134
 5 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-493

<400> 134

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

<210> 135
 5 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-491

<400> 135

ES 2 727 137 T3

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

<210> 136
 5 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-489

<400> 136

ES 2 727 137 T3

```

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

```

<210> 137
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-490

<400> 137

ES 2 727 137 T3

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

<210> 138
 5 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-487

<400> 138

ES 2 727 137 T3

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

<210> 139
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-485

<400> 139

ES 2 727 137 T3

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

<210> 140
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-484

<400> 140


```

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

```

<210> 141
 5 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-476

<400> 141

ES 2 727 137 T3

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

<210> 142
 <211> 440
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-475

10 <400> 142

ES 2 727 137 T3

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

<210> 143
 5 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-474

<400> 143

ES 2 727 137 T3

```

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

```

5 <210> 144
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> PH20 36-473

<400> 144

ES 2 727 137 T3

```

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

```

- 5 <210> 145
- <211> 437
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <223> PH20 36-472
- <400> 145

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

<210> 146
 5 <211> 436
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-471

<400> 146

```

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

```

5 <210> 147
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> PH20 36-470

<400> 147

ES 2 727 137 T3

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

<210> 148
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-469

<400> 148

ES 2 727 137 T3

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

<210> 149
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-468

<400> 149

ES 2 727 137 T3

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

<210> 150
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-466

<400> 150

```

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

```

<210> 151
 5 <211> 430
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-465

<400> 151

ES 2 727 137 T3

```

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

```

<210> 152
 5 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-500

<400> 152

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

<210> 153
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-498

<400> 153

```

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

```

5 <210> 154
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> PH20 36-496

<400> 154

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

<210> 155
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-494

<400> 155

ES 2 727 137 T3

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

<210> 156
 <211> 457
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-492

<400> 156

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

<210> 157
 5 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-488

<400> 157

ES 2 727 137 T3

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

<210> 158
 5 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> PH20 36-486

<400> 158

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

<210> 159
 5 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<220>
 10 <223> Precursora de PH20 de chimpancé XP_527873

<400> 159

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

<210> 160
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<220>

<223> PH20 madura de chimpancé XP_527873

<400> 160

```

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

```

<210> 161

<211> 477

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<220>

<223> PH20 madura de mono Rhesus EHH17639

5 <400> 161

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Ile 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 Asn Glu Pro
      20      25      30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Thr Leu Met Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ile
      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 Leu Thr Thr Gly Val Thr Val His Gly Gly Ile Pro
      65      70      75      80
Gln Lys Val Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ser Lys Gln Asp Ile
      85      90      95
Leu Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
      100     105     110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
      115     120     125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
      130     135     140
Ser Leu Pro Gln Ala Thr Asp Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
      145     150     155     160
Gly Lys Asp Phe Met Leu Glu Thr Ile Lys Leu Gly Arg Ser 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 Arg Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asp 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 Val Val Val 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 Asn Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr Ala Arg Leu Val
      260     265     270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Arg Glu Glu Leu Val Ser
      275     280     285
Thr Leu Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
      290     295     300
Gly Ser Leu Ser Ile Thr Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
      305     310     315     320
Thr 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 Asp Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
      355     360     365
Asn Phe Asp Ile Arg Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val His Gly
      370     375     380
Lys Pro Thr Val Glu Asp Leu Glu Glu Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
      385     390     395     400
Ser Cys Tyr Thr Asn 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
Ser Leu Lys Pro Pro Val Glu Thr Glu Gly Ser Pro Pro Ile Phe Tyr
      435     440     445
Asn Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser Thr Thr Met Phe Ile Trp Arg Leu
      450     455     460
Glu Val Trp Asp Gln Gly Ile Ser Arg Ile Gly Phe Phe
      465     470     475

```

<210> 162

<211> 475

<212> PRT

10

<213> Macaca fascicularis

<220>

<223> PH20 madura de mono Cynomolgus P38568.1

5

<400> 162

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Ile 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 Asn Glu Pro
      20      25      30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Thr Leu Met Gly Ser Pro Arg Ile Asn Val
      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 Leu Thr Thr Gly Val Thr Val His Gly Gly Ile Pro
65      70      75      80
Gln Lys Val Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ser Lys Gln Asp Ile
      85      90      95
Leu Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
      100      105      110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
      115      120      125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130      135      140
Ser Leu Pro Gln Ala Thr Asp Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145      150      155      160
Gly Lys Asp Phe Met Leu Glu Thr Ile Lys Leu Gly Arg Ser 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 Arg Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asp 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 Val Val Val 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 Asn Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr Ala Arg Leu Val
260      265      270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Arg Glu Glu Leu Val Ser
275      280      285
Thr Leu Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
290      295      300
Gly Ser Leu Ser Ile Thr Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305      310      315      320
Thr 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 Asp Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
355      360      365
Asn Phe Asp Ile Arg Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val His Gly
370      375      380
Lys Pro Thr Val Glu Asp Leu Glu Glu Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385      390      395      400
Ser Cys Tyr Thr Asn 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
Ser Leu Lys Pro Pro Val Glu Thr Glu Gly Ser Pro Pro Ile Phe Tyr
435      440      445
Asn Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser Thr Thr Met Phe Ile Val Asn Ile
450      455      460
Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
465      470      475

```

10 <210> 163

<211> 518

<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>

5 <223> PH20 madura de vaca

<400> 163

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

<210> 164
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

5

<220>
 <223> PH20 madura de vaca AAP55713

<400> 164

```

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

<210> 165
 <211> 477
 <212> PRT

15

<213> Mus musculus

<220>

<223> PH20 madura de ratón NP_001073344.1

5

<400> 165

```

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

```

10 <210> 166

<211> 477

<212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>

5 <223> PH20 madura de rata NP_446419.1

<400> 166

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

10

<210> 167

<211> 510
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

5 <220>
 <223> PH20 madura de conejo NP_001076141.1
 <400> 167

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

ES 2 727 137 T3

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

<210> 168
<211> 494
<212> PRT
<213> *Cavia porcellus*

<220>
<223> PH20 madura de cobaya NP_001166492.1

<400> 168

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

145					150				155				160
Lys	Ala	Phe	Met	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Gly	Lys	Ser	Leu
				165					170				175
Ser	Ser	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys	Tyr	Asn
			180					185					190
Phe	Thr	Lys	Pro	Asn	Tyr	Asp	Gly	His	Cys	Pro	Pro	Ile	Glu
		195					200					205	
Arg	Asn	Asn	Asp	Leu	Gln	Trp	Leu	Trp	Asn	Asp	Ser	Thr	Ala
	210					215							Leu
Pro	Ser	Val	Tyr	Leu	Thr	Ser	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Gln	Asn
225					230					235			Gly
Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	His	Glu	Ser	Ile	Arg	Val	Ser
			245						250				Lys
Met	Asp	Asp	Lys	Asn	Pro	Leu	Pro	Ile	Tyr	Val	Tyr	Ile	Arg
			260					265					Leu
Phe	Thr	Asp	Gln	Thr	Thr	Thr	Phe	Leu	Glu	Leu	Asp	Asp	Leu
		275					280				285		Val
Ser	Val	Gly	Glu	Ile	Val	Pro	Leu	Gly	Val	Ser	Gly	Ile	Ile
	290					295					300		Trp
Gly	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Val	Ser	Cys	Ile	Gly
305					310					315			Leu
Asn	Tyr	Met	Lys	Gly	Thr	Leu	Leu	Pro	Tyr	Leu	Ile	Asn	Val
			325						330				Thr
Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Gly	Gln	Val	Leu	Cys	Lys	Asn	Gln	Gly
			340					345					Ile
Thr	Arg	Lys	Asp	Trp	Asn	Thr	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Leu	Asn
		355					360					365	Ala
Asn	Phe	Asp	Ile	Glu	Leu	Gln	Asn	Gly	Lys	Phe	Val	Val	His
	370					375				380			Gly
Lys	Pro	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gln	Glu	Phe	Ser	Lys	Asn	Phe
385					390					395			His
Ser	Cys	Tyr	Thr	Asn	Val	Ala	Cys	Lys	Asp	Arg	Leu	Asp	Val
				405					410				His
Val	Arg	Ser	Val	Asn	Val	Cys	Thr	Ala	Asn	Asn	Ile	Cys	Ile
		420						425					Asp
Val	Leu	Asn	Phe	Pro	Ser	Leu	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu	Pro	Pro
		435					440					445	Ile
Asp	Asp	Thr	Ser	Gln	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Asp	Ile	Thr
	450					455					460		Ser
Ala	Pro	Pro	Ser	Ser	His	Ile	Leu	Pro	Lys	Asp	Leu	Ser	Trp
465					470					475			Cys
Phe	Leu	Leu	Ser	Ile	Phe	Ser	Gln	His	Trp	Lys	Tyr	Leu	Leu
				485					490				

<210> 169
 <211> 540
 5 <212> PRT
 <213> Vulpes vulpes

<220>
 <223> Precursora de PH20 de zorro rojo

10 <400> 169

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

65					70					75				80	
Lys	Thr	Val	Val	Gly	Gln	Gly	Ile	Ala	Ile	Phe	Tyr	Ala	Asp	Arg	Leu
				85					90					95	
Gly	Tyr	Tyr	Pro	His	Ile	Asn	Lys	Thr	Thr	Gly	Lys	His	Val	Asn	Gly
			100					105					110		
Gly	Ile	Pro	Gln	Leu	Gly	Ser	Leu	Lys	Lys	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys
		115				120						125			
Lys	Asp	Ile	Ser	His	Tyr	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser	Met	Gly	Leu	Ala	Val
	130					135					140				
Ile	Asp	Trp	Asp	Ser	Trp	Arg	Pro	Asn	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Arg	Pro
145					150					155					160
Lys	His	Ile	Tyr	Lys	Glu	Gln	Ser	Ile	Asp	Leu	Ala	Gln	Gln	Gln	His
				165					170					175	
Ile	His	Leu	Asn	Leu	Thr	Glu	Val	Thr	Gln	Ile	Ala	Gln	Ala	Asp	Phe
			180					185					190		
Glu	Lys	Ala	Ala	Arg	Cys	Phe	Met	Gln	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Gly	Lys
		195				200					205				
Phe	Leu	Arg	Pro	Asn	Tyr	Leu	Trp	Gly	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Pro	Asp	Cys
	210					215					220				
Tyr	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Asn	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Tyr	Asp
225					230					235					240
Ile	Glu	Glu	Arg	Arg	Asn	Asp	Glu	Ile	Asp	Trp	Leu	Trp	Lys	Glu	Ser
				245					250					255	
Thr	Ala	Leu	Phe	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	Lys	Ser	Ser
			260					265					270		
Pro	Phe	Thr	Ala	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Leu	Glu	Ala	Ile	Arg
		275					280					285			
Val	Ser	Lys	Val	Lys	Asp	Ile	Lys	His	Pro	Leu	Pro	Ile	Phe	Val	Tyr
	290					295					300				
Ala	Arg	Pro	Val	Phe	Thr	Asp	Val	Leu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asp
305					310					315					320
Asp	Leu	Val	Asn	Thr	Ile	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Gly
			325						330					335	
Ile	Val	Met	Trp	Gly	Ser	Leu	Asn	Leu	Thr	Glu	Asn	Val	Gln	Ile	Cys
		340						345					350		
Thr	Glu	Leu	Asp	Thr	Tyr	Ile	Lys	Asn	Lys	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile
	355						360					365			
Asn	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Asp
	370					375						380			
Glu	Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	His	Trp	Asn	Ser	Asn	Asp	Tyr	Leu	His
385					390					395					400
Leu	Asn	Pro	Val	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Arg	Ser	Gly	Arg	Tyr
			405						410					415	
Thr	Val	Gln	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Gln	Gln	Phe	Ser	Lys
			420					425					430		
Lys	Phe	Tyr	Cys	Ala	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	His	Cys	Arg	Glu	Arg	Val
	435						440					445			
Asp	Met	Thr	Asp	Ile	His	Thr	Ile	Lys	Val	Cys	Val	Gly	Glu	Asp	Val
	450					455					460				
Cys	Ile	Asp	Val	Tyr	Leu	Asn	Leu	Val	Pro	Ser	Gly	His	Leu	Pro	Val
465					470					475					480
Trp	Lys	Gly	Lys	Tyr	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Ile	Phe	Ser	Val	Met	Pro
			485						490					495	
Pro	Ala	Thr	Gly	Pro	Pro	Cys	Val	Pro	Gly	Arg	Asp	Leu	Asn	Arg	Cys
			500					505					510		
Leu	Lys	Ala	Arg	Phe	Ile	Val	Glu	Asp	Asn	Ser	Lys	Thr	Thr	Gln	Thr
		515					520					525			
Gly	Tyr	Gln	Ser	Ile	Tyr	Ile	Lys	Asn	Lys	Lys	Gln				
	530					535					540				

<210> 170
 <211> 505
 5 <212> PRT
 <213> Vulpes vulpes

<220>
 <223> PH20 madura de zorro rojo Q29152

10 <400> 170

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

<210> 171
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Vespula vulgaris*

<220>

<223> hialuronidasa de avispa chaqueta amarilla

<400> 171

```

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

```

5

<210> 172

<211> 340

<212> PRT

10 <213> Vesputa vulgaris

<220>

<223> hialuronidasa de avispa chaqueta amarilla

15 <400> 172

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

<210> 173
 <211> 382
 5 <212> PRT
 <213> Apis mellifera

<220>
 <223> hialuronidasa de abeja melífera

10 <400> 173

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

<210> 174

<211> 331

5 <212> PRT

<213> Dolichovespula maculata

<220>

<223> hialuronidasa de avispa de cara blanca

10

<400> 174

Ser	Glu	Arg	Pro	Lys	Arg	Val	Phe	Asn	Ile	Tyr	Trp	Asn	Val	Pro	Thr
1				5					10					15	
Phe	Met	Cys	His	Gln	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Phe	Asp	Glu	Val	Thr	Asn	Phe

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

<210> 175
<211> 367
<212> PRT
<213> Polistes annularis

<220>
<223> hialuronidasa de avispa de papel

<400> 175

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

ES 2 727 137 T3

				100						105					110				
Leu	Gln	Gln	Phe	Asn	Glu	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Thr	Pro	Asp	Lys	Asn				
		115						120					125						
Phe	Gly	Gly	Ile	Gly	Val	Ile	Asp	Phe	Glu	Arg	Trp	Lys	Pro	Ile	Phe				
	130						135					140							
Arg	Gln	Asn	Trp	Gly	Asn	Thr	Glu	Ile	His	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ile	Glu				
145					150					155					160				
Leu	Val	Arg	Lys	Glu	His	Pro	Lys	Trp	Ser	Glu	Ser	Met	Ile	Glu	Ala				
				165					170					175					
Glu	Ala	Thr	Lys	Lys	Phe	Glu	Lys	Tyr	Ala	Arg	Tyr	Phe	Met	Glu	Glu				
			180					185					190						
Thr	Leu	Lys	Leu	Ala	Lys	Lys	Thr	Arg	Lys	Arg	Ala	Lys	Trp	Gly	Tyr				
	195						200					205							
Tyr	Gly	Phe	Pro	Tyr	Cys	Tyr	Asn	Val	Thr	Pro	Asn	Asn	Pro	Gly	Pro				
	210					215						220							
Asp	Cys	Asp	Ala	Lys	Ala	Thr	Ile	Glu	Asn	Asp	Arg	Leu	Ser	Trp	Met				
225					230				235						240				
Tyr	Asn	Asn	Gln	Glu	Ile	Leu	Phe	Pro	Ser	Val	Tyr	Val	Arg	His	Glu				
				245					250					255					
Gln	Lys	Pro	Glu	Glu	Arg	Val	Tyr	Leu	Val	Gln	Gly	Arg	Ile	Lys	Glu				
			260					265					270						
Ala	Val	Arg	Ile	Ser	Asn	Asn	Leu	Glu	His	Ser	Pro	Ser	Val	Leu	Ala				
	275						280					285							
Tyr	Trp	Trp	Tyr	Val	Tyr	Gln	Asp	Lys	Met	Asp	Ile	Tyr	Leu	Ser	Glu				
	290					295					300								
Thr	Asp	Val	Glu	Lys	Thr	Phe	Gln	Glu	Ile	Val	Thr	Asn	Gly	Gly	Asp				
305					310					315					320				
Gly	Ile	Ile	Ile	Trp	Gly	Ser	Ser	Ser	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Ser	Lys				
				325					330					335					
Cys	Lys	Arg	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Asn	Thr	Leu	Gly	Pro	Phe	Ala				
			340					345					350						
Val	Asn	Val	Thr	Glu	Thr	Val	Asn	Gly	Arg	Ser	Ser	Leu	Asn	Phe					
		355					360					365							

<210> 176
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<220>
 <223> hialuronidasa bovina

<400> 176

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

ES 2 727 137 T3

```

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

```

<210> 177
 <211> 553
 5 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<220>
 <223> bovina (precursora de PH20)

10 <400> 177

```

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

```

ES 2 727 137 T3

			100					105					110				
Gly	Gly	Ile	Pro	Gln	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Ser	His	Met	Glu	Lys	Ala		
			115					120					125				
Lys	Asn	Asp	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Pro	Asn	Asp	Ser	Val	Gly	Leu	Ala		
			130					135					140				
Val	Ile	Asp	Trp	Glu	Asn	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys		
145			150					155					160				
Pro	Lys	Asp	Val	Tyr	Arg	Asp	Glu	Ser	Val	Glu	Leu	Val	Leu	Gln	Lys		
			165					170					175				
Asn	Pro	Gln	Leu	Ser	Phe	Pro	Glu	Ala	Ser	Lys	Ile	Ala	Lys	Val	Asp		
			180					185					190				
Phe	Glu	Thr	Ala	Gly	Lys	Ser	Phe	Met	Gln	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Gly		
			195					200					205				
Lys	Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp		
			210					215					220				
Cys	Tyr	Asn	His	Asn	His	Asn	Gln	Pro	Thr	Tyr	Asn	Gly	Asn	Cys	Pro		
225			230					235					240				
Asp	Val	Glu	Lys	Arg	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Glu	Trp	Leu	Trp	Lys	Glu		
			245					250					255				
Ser	Thr	Ala	Leu	Phe	Pro	Ser	Val	Tyr	Leu	Asn	Ile	Arg	Leu	Lys	Ser		
			260					265					270				
Thr	Gln	Asn	Ala	Ala	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Gln	Glu	Ala	Ile		
			275					280					285				
Arg	Leu	Ser	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Val		
			290					295					300				
Tyr	Ala	Arg	Pro	Val	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Gln		
			310					315					320				
Gly	Asp	Leu	Val	Asn	Ser	Val	Gly	Glu	Ile	Val	Ser	Leu	Gly	Ala	Ser		
			325					330					335				
Gly	Ile	Ile	Met	Trp	Gly	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	Met	Gln	Ser		
			340					345					350				
Cys	Met	Asn	Leu	Gly	Thr	Tyr	Leu	Asn	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile		
			355					360					365				
Ile	Asn	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	His		
			370					375					380				
Asn	Glu	Gly	Val	Cys	Thr	Arg	Lys	His	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu		
			385					390					395				
His	Leu	Asn	Pro	Met	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Thr	Gly	Glu	Gly	Gly	Lys		
			405					410					415				
Tyr	Thr	Val	Pro	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Gln	Lys	Phe	Ser		
			420					425					430				
Asp	Thr	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ile	His	Cys	Lys	Lys	Arg		
			435					440					445				
Val	Asp	Ile	Lys	Asn	Val	His	Ser	Val	Asn	Val	Cys	Met	Ala	Glu	Asp		
			450					455					460				
Ile	Cys	Ile	Asp	Ser	Pro	Val	Lys	Leu	Gln	Pro	Ser	Asp	His	Ser	Ser		
			465					470					475				
Ser	Gln	Glu	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Phe	Ser	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Thr		
			485					490					495				
Thr	Thr	Ala	Thr	Val	Ser	Pro	Cys	Thr	Pro	Glu	Lys	His	Ser	Pro	Glu		
			500					505					510				
Cys	Leu	Lys	Val	Arg	Cys	Ser	Glu	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Thr	Gln	Lys		
			515					520					525				
Ala	Cys	Gln	Ser	Val	Lys	Leu	Lys	Asn	Ile	Ser	Tyr	Gln	Ser	Pro	Ile		
			530					535					540				
Gln	Asn	Ile	Lys														

<210> 178
<211> 474
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<223> precursora de PH20

<400> 178

```

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
Cys Leu Ala Leu Asp Phe Arg Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser
      35      40      45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Val Glu Arg Cys Val Asn Arg Arg
 50      55      60
Phe Gln Leu Pro Pro Asp Leu Arg Leu Phe Ser Val Lys Gly Ser Pro
 65      70      75      80
Gln Lys Ser Ala Thr Gly Gln Phe Ile Thr Leu Phe Tyr Ala Asp Arg
      85      90      95
Leu Gly Tyr Tyr Pro His Ile Asp Glu Lys Thr Gly Lys Thr Val Phe
      100      105      110
Gly Gly Ile Pro Gln Leu Gly Asn Leu Lys Ser His 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
Val Ile Asp Trp Glu Asn Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys
      145      150      155      160
Pro Lys Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Gln Lys
      165      170      175
Asn Pro Gln Leu Ser Phe Pro Glu Ala Ser Lys Ile Ala Lys Val Asp
      180      185      190
Phe Glu Thr Ala Gly Lys Ser Phe Met Gln Glu Thr Leu Lys Leu Gly
      195      200      205
Lys Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp
      210      215      220
Cys Tyr Asn His Asn His Asn Gln Pro Thr Tyr Asn Gly Asn Cys Pro
      225      230      235      240
Asp Val Glu Lys Arg Arg Asn Asp Asp Leu Glu Trp Leu Trp Lys Glu
      245      250      255
Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asn Ile Arg Leu Lys Ser
      260      265      270
Thr Gln Asn Ala Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Gln Glu Ala Ile
      275      280      285
Arg Leu Ser Lys Ile Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val
      290      295      300
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
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
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
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
Val Cys Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro
465      470

```

<210> 179
 5 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> precursora de PH20 variante P48A

<400> 179

```

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

```

5 <210> 180
 <211> 509
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> precursora de PH20 variante L499W

5

<400> 180

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

<210> 181
<211> 2105
<212> ADN
<213> Bos taurus

5

<220>
<223> ADN de PH20 bovina

<400> 181

```

ggtttatctc tgttcttggt gaggagacag acagaattga ctgctgtgct catccgagag 60
ggtaaatgtg ctcagctctt tatggagtag tggagacggg cagagatgac aagatgaagc 120
aacttgcaaa acattcctaa atacgaagga agaagaatat ttaaatgtaa atcatcatta 180
ttcattttta tccatcaaag tggcttcatt ctgtgttcat atcttgcatc aaatattagg 240
tacaccaaag cgtgtaggag aaaaaagtgc ctttcacagt catcgctctt tgtgatgaga 300
atgctgaggc gccaccatat ctcccttcgg agctttgctg ggtctagcgg aacaccccag 360
gcagtgttca ccttccttct gcttcctgtg tgtttggctc tggacttcag agcacccccct 420
cttatttcaa acacttcttt cctctgggcc tggaatgccc cagttgaacg ttgtgttaac 480
agaagatttc aactacctcc agatctgaga ctcttctctg taaaaggaag cccccagaaa 540
agtgtaccg gacaatttat tacattatct tatgtctgata gacttggtta ctatcctcat 600
atagatgaaa aaacaggcaa aaccgtattc ggaggaattc cccagttggg aaacttaaaa 660
agtcatatgg agaaagcaaa aaatgacatt gcctattaca taccaaatga cagcgtgggc 720
ttggcgggtc ttgactggga aaactggagg cctacctggg caagaaactg gaaacctaaa 780
gatgtttaca gggatgagtc agttgagttg gttctgcaaa aaaatccgca actcagtttc 840
ccagaggctt ccaagattgc aaaagtggat tttgagacag caggaaagag tttcatgcaa 900
gagactttta aactgggaaa attacttcgg ccaaactact tatgggggta ttatcttttt 960
cctgattgtt acaatcataa tcataaccaa cctacttaca atggaaattg ccctgatgta 1020
gaaaaaagga gaaatgatga tctcgagtgg ttgtggaagg aaagcactgc ccttttcctt 1080
tctgtttatt tgaatatcag gttaaaatct actcaaaatg ctgccttgta tgttcgtaat 1140
cgtgtccagg aagccattcg gttgtctaaa atagcgagtg tcgaaagtcc acttccggtt 1200
tttgtatatg cccgtccagt ttttactgat gggcttcaa catatctttc tcagggtgac 1260
cttgtgaatt cgggttggtg gatcgtttct ctagggtgcct ctgggattat aatgtggggc 1320
agtctcaatc taagcttata tatgcaatct tgcataaacc taggcactta cttgaacact 1380
aactgaatc cttacataat caacgtcacc ctagccgcca aaatgtgcag ccaagtgtt 1440
tgccacaatg aaggagtgtg tacaaggaaa cactggaatt caagcgacta tcttcacctg 1500
aacccaatga attttgctat tcaaactggg gaaggtggaa aatacacagt acctgggaca 1560
gtcacacttg aagacttgca aaagttttct gatacatttt attgcagttg ttatgccaac 1620
atccactgta agaagagagt tgatataaaa aatgttcata gtgttaacgt gtgtatggca 1680
gaagacattt gtatagacag ccctgtgaag ttacaacca gtgatcattc ctccagccag 1740
gaggcatcta ctaccacctt cagcagtatc tcaccctcca ctacaactgc cacagtatct 1800
ccatgtactc ctgagaaaca ctcccctgag tgcctcaaag tcaggtgttc ggaagtcatc 1860
cccaacgtca cccaaaaggc gtgtcaaagt gttaaattga agaacatttc ctatcagtca 1920
cctattcaaa atattaaaaa tcaaacacc tattaaaatt aaattcagta aaaaaaaaaa 1980
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2040
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2100
aaaaa 2105

```

10

<210> 182
<211> 1971
<212> ADN
<213> Bos taurus

15

<220>
<223> ADN de Hyal1 bovina

20

<400> 182

ES 2 727 137 T3

```

ttggtgcgcc tgggtgccaga ctttaaggaac agaattcttgc tgatgcctgc acaggccctc 60
gccctggggt caggaagttt ggagaatgag gccttttcagc cttgaggttt ccctacacct 120
gccctgggct atggcagccc acttgcttcc tgtctgcacc ctgttcctga acttgctcag 180
catgacccaa ggctcccggt accctgtggt cccaaccag cccttacta ccatctggaa 240
tgccaacacc gagtggtgta tgaagaaaca cggcgtggac gtagacatca gtatctttga 300
tgtggtgacc aacccggggc agaccttccg cggccctaac atgaccattt tctacagctc 360
ccagctgggt acctaccctt actatacatc tgctggggag cctgtgtttg gtggcctgcc 420
ccagaatgcc agcctgaatg cccacctggc ccgcacattc caggacatcc tggctgccat 480
gcctgagcct cgcttctcag ggctggcagt cattgactgg gaggcattgg gcccgcgctg 540
ggccttcaac tgggacacca aggacattta ccggcagcgc tcacgggcat tggtagagaa 600
gcagacacca gactggctag ctctcgggtt ggaggccgca gctcaggacc agttcgaggg 660
ggctgcagag gagtgatgg caggcaccct caagctggga caagcactgc gccctcaggg 720
cctctggggc ttctataatt tccctgagtg ctacaactat gactttaaaa gtcccaacta 780
tacaggccgg tgtccactaa acatctgtgc ccagaatgac cagctcgggt ggctgtgggg 840
ccagagccgt gccctctacc ccagcatcta cctgcctgca gcaactggag gcacgaagaa 900
gacacagatg ttcgtgcagc accgtgtggc tgaggcattc cgtgtggcag cgggtgcggg 960
ggacccaag ctgccgtgc tgcctacat gcagctcttc tacgacatga ctaaccactt 1020
tctgcccgcg gaggagctgg agcacagcct gggggagagt gcagcccagg gtgcagcggg 1080
agtgggtgctc tgggtgagct ggctgagcac aagcaccaag gaatcatgcc aggccatcaa 1140
ggagtatgtg gacacgacgc tgggaccctc catcctgaat gtgaccagcg gggctcgtct 1200
gtgcagtcag gtcctatgct ccggccatgg ccgttgtgcc cggcgcccca gttaccccaa 1260
ggcccgctc atcctcaact ccaccagttt ttocatcaag cctacacctg gtggtggggc 1320
cctgacccta caagtgccc tctcgctcga ggatcggttg cggatggcag tggagttcga 1380
atgtcgctgc taccgtgggt ggagggggac acgggtgtgag cagtggggca tgtggtgatt 1440
ggcatgggca cgactgagt acctgatgca agctgggcct ggctaggtag ggctttcca 1500
agtccaggca gtcacaggag tcatggttac agtcagaagt ccactcagcc agtgtcatga 1560
gcatacacca gtgtgcacac ctgcttacag accaagatag ctgcataagg acacggtgtg 1620
agcagtgggg catatgctga ttggcatggg cacacactga gtacctgatg caatctgggc 1680
ctggctaggg ctttcccaag tccaggcagt cacaggagtc atggttaggc atccagtcac 1740
aggagtcagt tcaggcatcc tgcgacaga gtcaaaaata cttcctctgg agacactgag 1800
tcagtcttca aacagaagca gtcacaagca ctgacattcg ggacttcctt ggccatccag 1860
tggttaagac acggagcttc cactgcaggg ggcacgggca gagactaaga tcacgaatgc 1920
taagcgggtgc ggttaaacaata ataacaataa aataaactga cattcactgg g 1971

```

<210> 183
 <211> 1912
 5 <212> ADN
 <213> Bos taurus

<220>
 <223> ADN de Hyal2 bovina

10 <400> 183

```

caagtcgccc gggggtgcc caaagggcag gagctggcgc gaatagcttg gctagagact 60
taccocggga aggaggagg cgcggacact actgggcccga cggactccca cacagttcct 120
gagctgggtgc ctggcagggtg aactgactt cctgcagccc ccagcatgtg gacaggcctg 180
ggccccgcgc tcacactggc cctggtgttg gtggtggcat gggccacgga gctgaagccc 240
acagcaccac ccattctcac gggccggccc tttgtggtcg catgggatgt gccacacag 300
gactgtggcc cgcgccacaa gatgccattg gacccaaagg acatgaaggc ctttcatgtt 360
caggcttcac ctaacgaggg tttgtaaat cagaacatca ccattctcta ccgtgaccgg 420
ctgggcatgt atccacactt caattcgggtg gggagggtcag tacatgggtg tgtgccacag 480
aatggcagcc tctgggtaca cctggagatg ctgaaggagc acgtggaaca ctacattcgt 540
acacaggagc ctgcagggtt ggcagtcac gactgggagg actggcggcc agtgtgggtg 600
cgcaactggc aggacaagga tgtgtaccgc cgattatcac gccatttggg agccattcgc 660
caccctgatt ggccaccaga gcgcgtagcc aaggaggcgc agtatgagtt tgagttcgct 720
gcacggcagt tcatgctgga gacattgcga tttgtcaagg cgtttcggcc tcggcaccta 780
tggggcttct acctcttccc tgactgttac aaccatgatt atgtgcagaa ctgggagacc 840
tatacaggcc gctgccctga tgttgaggtc tcccgaatg accagctggc ctggctctgg 900
gccgagagca cggccctctt cccctctgtc tacttggaag agacactggc ttcctccact 960
cacggccgca actttgtcag ctttcgtgtc caggaggctc ttcgcgtggc tgacgtccac 1020
catgccaaac atgcaactccc cgtctacgtc ttcacgaggc ccacctatag ccgtggactc 1080
acagggctta gcgagatgga tctcatctcc accattggtg agagtgtgc cctgggtgca 1140
gctggcgtca tcctctgggg tgacgcaggg tttaccacca gcaacgagac ctgccgacgc 1200
ctcaaggatt atctgactcg gtcattggta ccctatgtcg tcaatgtgtc ctgggctgcc 1260
cagtactgca gctgggcccga gtgccatggc catgggcgct gtgtgcgcgc ggaccccaac 1320
gctcacacct tcctgcacct cagtgccagc agcttccgtc tagtgccctag ccacgcacct 1380
gatgagccgc ggctgcgacc agagggggaa ctcagttggg ccgaccgcaa ccacctacag 1440
atgcactttc gctgccagtg ctacttaggc tggggcggtg agcaatgcca ctgggaccgc 1500
aggcgggcag ctgggggtgc cagtggggcc tgggctgggt cccacctcac tggcctgtg 1560
gcagtggcag tcctggcctt caccatagact ttgtaagggt ctctcaccga gctgccacgc 1620
cagctggcct ctgccacaag gggctctgtc ggcattgtag agcctgcaag ggggtggaaa 1680
accagagctt ggaggggcag agccctctgg gatgcctgg aggatgtcct taccagctcc 1740
caccctctgt tctaaggggg aggggcagtc ccctggaagg cccctctctt ccctgccaga 1800
gaggaagagg ggcacagctg ggcgggggag gacctgacct tactccctg cccctggata 1860
gtttattatt attattttgg ggtctctttt gtaaatataa tataaaacaa ct 1912

```

<210> 184
 <211> 476
 5 <212> PRT
 <213> Ovis aries

<220>
 <223> hialuronidasa 2 de oveja (Ovis aries)

10 <400> 184

```

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

```

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

<210> 185
<211> 114
<212> PRT
<213> Ovis aries

<223> secuencia parcial de PH20 de oveja (*Ovis aries*)

<400> 185

[illegible]

<210> 186
<211> 520
<212> PRT
<213> Ovis aries

<220>

<223> proteína PH20 de oveja (Ovis aries)

<400> 186

Leu	Asp	Phe	Pro	Ala	Pro	Pro	Leu	Ile	Ser	Asn	Thr	Ser	Phe	Leu	Trp
1				5					10					15	
Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Ala	Glu	Arg	Cys	Val	Lys	Ile	Phe	Lys	Leu	Pro
		20						25					30		
Pro	Asp	Leu	Arg	Leu	Phe	Ser	Val	Lys	Gly	Ser	Pro	Gln	Lys	Ser	Ala
		35					40					45			
Thr	Gly	Gln	Phe	Ile	Thr	Leu	Phe	Tyr	Ala	Asp	Arg	Leu	Gly	Tyr	Tyr
	50					55					60				
Pro	His	Ile	Asp	Glu	Lys	Thr	Gly	Asn	Thr	Val	Tyr	Gly	Gly	Ile	Pro
65					70					75					80
Gln	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Asn	His	Leu	Glu	Lys	Ala	Lys	Lys	Asp	Ile
			85						90					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			
Tyr	Arg	Asp	Glu	Ser	Val	Glu	Leu	Val	Leu	Gln	Lys	Asn	Pro	Gln	Leu
	130					135					140				
Ser	Phe	Pro	Glu	Ala	Ser	Lys	Ile	Ala	Lys	Val	Asp	Phe	Glu	Thr	Ala
145					150					155					160
Gly	Lys	Ser	Phe	Met	Gln	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu	Arg
				165					170					175	
Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys	Tyr	Asn	His
			180					185					190		
Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Thr	Tyr	Asn	Gly	Asn	Cys	Ser	Asp	Leu	Glu	Lys
	195						200					205			
Arg	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Asp	Trp	Leu	Trp	Lys	Glu	Ser	Thr	Ala	Leu
	210				215						220				
Phe	Pro	Ser	Val	Tyr	Leu	Asn	Ile	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Pro	Lys	Ala
225					230					235					240
Ala	Phe	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Gln	Glu	Ala	Ile	Arg	Leu	Ser	Lys
				245					250					255	
Ile	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Val	Tyr	His	Arg	Pro
			260					265					270		
Val	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Gln	Gly	Asp	Leu	Val
		275					280					285			
Asn	Ser	Val	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Ile	Met
	290					295					300				
Trp	Gly	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Met	Gln	Ser	Cys	Met	Asn	Leu
305				310						315					320
Gly	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn	Val	Thr	Leu
			325						330					335	
Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	His	Asp	Glu	Gly	Val	Cys
			340					345					350		
Thr	Arg	Lys	Gln	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu	Asn	Pro	Ile
		355					360					365			
Met	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Thr	Gly	Lys	Gly	Gly	Lys	Tyr	Thr	Val	Pro
	370					375					380				
Gly	Lys	Val	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Gln	Thr	Phe	Ser	Asp	Lys	Phe	Tyr
385				390						395					400
Cys	Ser	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ile	Asn	Cys	Lys	Lys	Arg	Val	Asp	Ile	Lys
			405						410					415	
Asn	Val	His	Ser	Val	Asn	Val	Cys	Met	Ala	Glu	Asp	Ile	Cys	Ile	Glu
			420					425					430		
Gly	Pro	Val	Lys	Leu	Gln	Pro	Ser	Asp	His	Ser	Ser	Ser	Gln	Asn	Glu
		435					440					445			
Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Thr	Thr	Ala	Thr
	450					455					460				
Thr	Val	Val	Ser	Pro	Cys	Thr	Pro	Glu	Lys	Gln	Ser	Pro	Glu	Cys	Leu
465				470						475					480
Lys	Val	Arg	Cys	Leu	Glu	Ala	Ile	Ala	Asn	Val	Thr	Gln	Thr	Gly	Cys
			485						490					495	
Gln	Gly	Val	Lys	Trp	Lys	Asn	Thr	Ser	Ser	Gln	Ser	Gln	Ser	Ser	Ile
			500					505					510		
Gln	Asn	Ile	Lys	Asn	Gln	Thr	Thr								
		515					520								

<210> 187
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

5

<220>
 <223> proteína PH20 de oveja (Ovis aries)

<400> 187

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

10

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

<210> 188
 <211> 1620
 5 <212> ADN
 <213> Ovis aries

<220>
 <223> codificante de PH20 de oveja

10 <400> 188

```

ttttccgtgt tgggttggtc tggacttcag agcaccctc ctcatttcaa acatttcttt 60
cctctggggc tggaatgccc cagctgaacg ttgtattaaa atctttaaac tacctccaga 120
tctgagactc ttctctgtaa aaggaagccc ccaaaaaagt gctacgggac aatttattac 180
attattttat gctgatagac ttggctacta tcctcatata gatgaaaaaa caggcaaac 240
tgtatatgga ggaattcccc agttgggaaa cttaaaaaat catttggaag aagccaaaaa 300
agacattgcc tattacatac caaatgacag cgtgggcttg gcggtcattg actgggaaaa 360
ctggaggcct acctgggcaa gaaactggaa acctaaagat gtttacaggg atgagtctgt 420
tgagttggtt 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
cgactgggtg tgggaaggaa gcaactgccct ttcccttctt gtttatttga atatcaagtt 720
aaaatctact ccaaaagctg ccttctatgt tcgtaatcgt gtccaggaag ccattcgggt 780
gtctaaaata gcgagtgttg aaagtcactt tccggttttt gtatatcacc gtccagtttt 840
tactgatggg tcttcaacat acctttctca ggggtgacct gtgaattcgg ttgggtgagat 900
cgttgctcta ggtgcctctg ggattataat gtggggcagt ctcaatctaa gcctaactat 960
gcaatcttgc atgaacctag gcaattactt gaacactaca ctgaatcctt acataatcaa 1020
cgtcacccta gcagccaaaa tgtgcagcca agtgctttgc cacgatgaag gagtgtgtac 1080
aaggaaacaa tgggaattcaa gcgactatct tcacctgaac ccaatgaatt ttgctattca 1140
aactgggaaa ggtggaaaaa acacagtacc tgggaaagtc acactgaag acctgcaaac 1200
gttttctgat aaattttatt gcagttgtta tgccaacatc aactgtaaga agagagttga 1260
tataaaaaat gttcatagtg ttaatgtatg tatggcagaa gacatttgta tagagggccc 1320
tgtgaagtta caaccagtg atcattcctc tagccagaat gaggcaccta ctaccaccgt 1380
cagcagctat tcaccctcta ctacagccac cacagtatct ccatgtactc ctgagaaaca 1440
gtcccctgag tgcctcaaaag tcaggtgttt ggaagccatc gccaacgtca ccaaacggg 1500
gtgtcaaggt gttaaatgga agaacacttc cagtcagtca agtattcaaa atattaaaaa 1560
tcaaacaacc tattaataa taaattcagt gcttataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620
    
```

<210> 189
<211> 1537
<212> ADN
<213> Ovis aries

5

<220>
<223> codificante de Hyal2 de oveja

<400> 189

```

gcaaatgaca ctgacttcct gcagccccc gcatgtggac aggcctgggc cccgccgtca 60
cactggccct ggtgttggtg gtggcatggg ccacagagct gaagcccaca gcaccacca 120
tcttcacggg cgggcccttt gtggttgcat gggatgtgcc cacacaggac tgtggcccac 180
gccacaagat gccattggac ccaaaggaca tgaaggcctt tgatgtgcag gcctcaccta 240
acgaggggtt tgtaaatcag aacatcacca tcttctaccg tgaccggctg ggcatgtatc 300
cacacttcaa ctcggtgggg aggtcagtc atggtggtgt gccacagaat ggcagcctct 360
gggtacacct ggagatgctg aaggacacg tggaaacta cattcgtaca caggagcctg 420
cagggtcggc agtcatcgac tgggaggact ggcggccagt gtgggtgcgc aactggcagg 480
acaaggatgt gtaccgccga ttatcacgcc agttggtggc cagtcaaccac cccgattggc 540
caccagagcg catagtcaag gaggcgcagt atgagtttga gttcgtctga cggcagttca 600
tgctggagac actgcgattt gtcaaggcgt ttccggcctc gcacctatgg ggcttctacc 660
tcttccctga ctgttacaac catgattatg tgcaaaactg ggagacctat acaggccgct 720
gccctgatgt tgaggtctcc cgaaatgacc agctgtcctg gctctgggcc gagagcacag 780
ccctcttccc ctctgtctac ctggaagaga cgctggcttc ctccactcac ggccgcaact 840
ttgtcagctt tcgtgtccag gaggtctctt gcgtggctga cgtccaccat gccaaacctg 900
cactcccagt ctacgtcttc acgaggccca cctacagccg tggactcaca gggttagcgt 960
agatggatct catctccacc attggtgaga gtgctgccct ggggtgcagcc ggcgtcatcc 1020
tctgggggtg cgcagggttt accaccagca acgagacctg ccgacgcctc aaggattatc 1080
tgactcggtc actggtaccc tatgtcgtca atgtgtcctg ggctgccag tactgcagct 1140
gggccagtg ccatggccat ggcgctgtg tgccgcggga cccaacgct cacaccttcc 1200
tgccacctag tgccagcagc ttccgtctag tgccctagcca cgcacctgat gagccgcggc 1260
tgccgaccaga gggggagctc agttgggccc accgcaacca cctacagacg cactttcgtc 1320
gccagtgcta cttaggctgg ggcggtgagc agtgccagtg ggaccgcagg cgggcagctg 1380
ggggtgccag tggggcctgg gctgggtccc acctcactgg cctgctggca gtggcagctc 1440
tggccttcac ctggacttcg taagggtctc acccagctgc caggccagct ggccctctgc 1500
acaaggggtc tgccaggcat gtacgagccc acaaggg 1537

```

10

<210> 190
<211> 1967
<212> ADN
<213> Ovis aries

15

<220>
<223> codificante de hialuronidasa de oveja

20 <400> 190

```

actcctgttt atctctgttc ttggtgagga gacagacaga attgactgct gtgctcatcc 60
accaggttac agatgaagca acttgcaaaa cattcctaaa tacgaaggaa gaagagtatt 120
taaacgtaaa tcatcattat tcatttttat ccatcaaagt agcttcattc tgtgttcccta 180
tcttgcacat aatattaggt aaaccaaagt gtgtaggaga aaaaagtgtc tttcatagtc 240
atcgtctctt gtgaagagaa tgctaaggcg ccgccatata tccttttagga gctttgttgg 300
ggccagtggg acaccccagg cggcgctcgc ctctcttctg ctcccatgtt ggttggctct 360
ggacttcaga gcaccccctc ttatttcaaa cacttctttc ctctgggcct ggaatgcccc 420
agctgaacgt tgtgttaaaa tctttaaact acctccagat ctgagactct tctctgtaaa 480
aggaagcccc caaaaaagtg ctacgggaca atttattaca ttattttatg ctgatagact 540
tggtactat cctcatatag atgaaaaaac aggcaacacc gtatatggag gaattcccca 600

```

```

gttgggaaac ttaaaaaatc atttgaaaa agccaaaaaa gacattgcct attatatacc 660
aaatgacagc gtgggcttgg cggtcattga ctgggaaaac tggaggccta cctgggcaag 720
aaactggaaa cctaaagatg tttacaggga tgagtctgtt gagggtgggtc tgcaaaaaaa 780
tccacaactc agtttcccag aggccttccaa gattgcaaaa gtggattttg agacagcagg 840
aaagagtttc atgcaagaga ctttaaaact gggaaaatta cttcggccaa atcacttatg 900
gggttattat ctttttcctg attgttacaa tcataattat aaccagccta cttacaatgg 960
aaattgctct gatttagaaa aaaggagaaa tgatgatctc gactggttgt ggaaggaaag 1020
cactgccctt ttcccttctg tttatttgaa tatcaagtta aaatctactc caaaagctgc 1080
cttctatggt cgtaatcgtg tccaggaagc cattcgggtg tctaaaatag cgagtgttga 1140
aagtccactt ccggtttttg tatatcaccg tccagttttt actgatgggt cttcaacata 1200
cctttctcag ggtgaccttg tgaattcggg ttggtgagatc gttgctctag gtgcctctgg 1260
gattataatg tggggcagtc tcaatctaag cctaactatg caatcttgca tgaacctagg 1320
caattacttg aacactacac tgaatcctta cataatcaac gtcaccctag cagccaaaat 1380
gtgcagccaa gtgctttgcc acgatgaagg agtgtgtaca aggaacaat ggaattcaag 1440
cgactatctt cacctgaacc caatgaattt tgctattcaa actgggaaag gtggaaaata 1500
cacagtacct gggaaagtca cacttgaaga cctgcaaacg ttttctgata aattttattg 1560
cagttgttat gccaacatca actgtaagaa gagagttgat ataaaaatg ttcatagtgt 1620
taatgtatgt atggcagaag acatttgtat agagggccct gtgaagttac aaccagtgta 1680
tcattcctct agccagaatg aggcactctac taccaccgtc agcagtatct caccctctac 1740
tacagccacc acagtatctc catgtactcc tgagaaacag tcccctgagt gcctcaaagt 1800
caggtgtttg gaagccatcg ccaacgtcac ccaaacgggg tgtcaagggtg ttaaatggaa 1860
gaacacttcc agtcagtcaa gtattcaaaa tattaaaaat caaacaacct attaaaatat 1920
aaattcagtg cttattaaga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1967

```

<210> 191
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<220>
 <223> hialuronidasa de cerdo

<400> 191

```

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

```

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

<210> 192
<211> 419
5 <212> PRT
<213> Sus scrofa

<220>
10 <223> hialuronidasa 3 de cerdo

<400> 192

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

ES 2 727 137 T3

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

<210> 193
 <211> 462
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> hialuronidasa de ratón

10 <400> 193

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

```

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

```

<210> 194

<211> 473

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> hialuronidasa 2 de ratón

10

<400> 194

```

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

```

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

<210> 195
<211> 412
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
10 <223> hialuronidasa 3 de ratón

<400> 195

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

ES 2 727 137 T3

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

<210> 196
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> Precursora de PH20 de ratón

<400> 196

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

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

<210> 197
 <211> 529
 5 <212> PRT
 <213> Cavia porcellus

<220>
 <223> Precursora de PH20 de cobaya

10 <400> 197

```

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
Leu Trp Val Trp Asn Ala Pro Thr Glu Phe Cys Ile Gly Gly Thr Asn
 50      55      60
Gln Pro Leu Asp Met Ser Phe Phe Ser Ile Val Gly Thr Pro Arg Lys
 65      70      75      80
Asn Ile Thr Gly Gln Ser Ile Thr Leu Tyr Tyr Val Asp Arg Leu Gly
 85      90      95
Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Pro His Thr Gly Ala Ile Val His Gly Gly
 100      105      110
Leu Pro Gln Leu Met Asn Leu Gln Gln His Leu Arg Lys Ser Arg Gln
 115      120      125
Asp Ile Leu Phe Tyr Met Pro Thr Asp Ser Val Gly Leu Ala Val Ile
 130      135      140
Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Thr Arg Asn Trp Arg Pro Lys
 145      150      155      160
Asp Ile Tyr Arg Asn Lys Ser Ile Glu Leu Val Lys Ser Gln His Pro
 165      170      175
Gln Tyr Asn His Ser Tyr Ala Val Ala Val Ala Lys Arg Asp Phe Glu
 180      185      190
Arg Thr Gly Lys Ala Phe Met Leu Glu Thr Leu Lys Leu Gly Lys Ser
 195      200      205
Leu Arg Pro Ser Ser Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr
 210      215      220
Asn Thr His Phe Thr Lys Pro Asn Tyr Asp Gly His Cys Pro Pro Ile
 225      230      235      240
Glu Leu Gln Arg Asn Asn Asp Leu Gln Trp Leu Trp Asn Asp Ser Thr
 245      250      255
Ala Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Val Arg Ser Ser Gln
 260      265      270
Asn Gly Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val His Glu Ser Ile Arg Val
 275      280      285
Ser Lys Leu Met Asp Asp Lys Asn Pro Leu Pro Ile Tyr Val Tyr Ile
 290      295      300
Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Thr Thr Thr Phe Leu Glu Leu Asp Asp
 305      310      315      320
Leu Val His Ser Val Gly Glu Ile Val Pro Leu Gly Val Ser Gly Ile
 325      330      335
Ile Ile Trp Gly Ser Leu Ser Leu Thr Arg Ser Leu Val Ser Cys Ile
 340      345      350
Gly Leu Glu Asn Tyr Met Lys Gly Thr Leu Leu Pro Tyr Leu Ile Asn
 355      360      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Gly Gln Val Leu Cys Lys Asn Gln
 370      375      380
Gly Ile Cys Thr Arg Lys Asp Trp Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Leu
 385      390      395      400
Asn Ala Thr Asn Phe Asp Ile Glu Leu Gln Gln Asn Gly Lys Phe Val
 405      410      415
Val His Gly Lys Pro Ser Leu Glu Asp Leu Gln Glu Phe Ser Lys Asn
 420      425      430
Phe His Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Val Ala Cys Lys Asp Arg Leu Asp
 435      440      445
Val His Asn Val Arg Ser Val Asn Val Cys Thr Ala Asn Asn Ile Cys
 450      455      460
Ile Asp Ala Val Leu Asn Phe Pro Ser Leu Asp Asp Asp Asp Glu Pro
 465      470      475      480
Pro Ile Thr Asp Asp Thr Ser Gln Asn Gln Asp Ser Ile Ser Asp Ile
 485      490      495
Thr Ser Ser Ala Pro Pro Ser Ser His Ile Leu Pro Lys Asp Leu Ser
 500      505      510
Trp Cys Leu Phe Leu Leu Ser Ile Phe Ser Gln His Trp Lys Tyr Leu
 515      520      525
Leu

```

<210> 198
 <211> 449
 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> hialuronidasa 1 de rata

5

<400> 198

```

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

```

10

<210> 199

<211> 473

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> hialuronidasa 2 de rata

<400> 199

```

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

```

<210> 200

<211> 412

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> hialuronidasa 3 de rata

<400> 200

```

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

```

<210> 201

<211> 512

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> Precursora de PH20 de rata

<400> 201

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

<210> 202
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Macaca mulata

<220>

<223> Precursora de PH20 de mono Rhesus

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

```

<210> 203

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

5 <220>
 <223> Precursora de PH20 de conejo

<400> 203

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

50		55		60
Gly Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Leu Phe Gly Ser Pro Arg				
65		70		75
Lys Asn Lys Thr Gly Gln Gly Ile Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu				80
		85		90
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Pro His Thr Gly Ala Ile Val His Gly				95
		100		105
Arg Ile Pro Gln Leu Gly Pro Leu Gln Gln His Leu Thr Lys Leu Arg				110
		115		120
Gln Glu Ile Leu Tyr Tyr Met Pro Lys Asp Asn Val Gly Leu Ala Val				125
		130		135
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Leu Pro Thr Trp Leu Arg Asn Trp Lys Pro				140
145		150		155
Lys Asp Ile Tyr Arg Ile Lys Ser Ile Glu Leu Val Lys Ser Gln His				160
		165		170
Pro Gln Tyr Asn His Ser Tyr Ala Thr Glu Lys Ala Lys Arg Asp Phe				175
		180		185
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Gly Arg				190
		195		200
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys				205
		210		215
Tyr Asn His His Tyr Asp Lys Pro Asn Leu Tyr Lys Gly Ser Cys Phe				220
225		230		235
Asp Ile Glu Lys Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Lys Glu				240
		245		250
Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Ala Arg Ser				255
		260		265
Ala Thr Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Val Val Arg Asn Arg Val His Glu				270
		275		280
Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile Pro Asp Asp Lys Ser Pro Leu Pro Asn				285
		290		295
Phe Val Tyr Thr Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Ile Phe Gln Phe Leu				300
305		310		315
Ser His His Asp Leu Val Tyr Thr Ile Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly				320
		325		330
Ala Ser Gly Ile Val Val Trp Gly Ser Gln Ser Leu Ala Arg Ser Met				335
		340		345
Lys Ser Cys Leu His Leu Asp Asn Tyr Met Lys Thr Ile Leu Asn Pro				350
		355		360
Tyr Leu Ile Asn Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Asn Gln Val Leu				365
		370		375
Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys Thr Arg Lys Asn Trp Asn Pro Asn Asp				380
385		390		395
Tyr Leu His Leu Asn Pro Gly Asn Phe Ala Ile Gln Leu Gly Ser Asn				400
		405		410
Gly Thr Tyr Lys Val Asp Gly Lys Pro Thr Leu Thr Asp Leu Glu Gln				415
		420		425
Phe Ser Lys Asn Phe Gln Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Asn Cys Lys				430
		435		440
Glu Arg Thr Asp Met Asn Asn Val Arg Thr Val Asn Val Cys Ala Val				445
		450		455
Glu Asn Val Cys Ile Asp Thr Asn Val Gly Pro Gln Ala Val Thr Tyr				460
465		470		475
Ala Pro Lys Glu Lys Lys Asp Val Ala His Ile Leu Ser Asn Thr Thr				480
		485		490
Ser Ile Asn Ser Ser Thr Thr Met Ser Leu Pro Phe Pro Arg Lys His				495
		500		505
Val Ser Gly Cys Leu Leu Val Leu Cys Met Tyr Ser Gln Tyr Leu Asn				510
		515		520
Ile Cys Tyr Arg Leu Val Ala Ile Gly Ile Gln His Gly Tyr Tyr Leu				525
		530		535
Lys				540
545				

<210> 204
 <211> 510
 5 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<220>
 <223> PH20 de chimpancé

<400> 204

```

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

```

5 <210> 205
 <211> 414
 <212> PRT

<213> Pongo pygmaeus

<220>

<223> Hialuronidasa 3 de orangután

5

<400> 205

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

10

<210> 206

<211> 510

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

15

<220>

<223> Precursora de PH20 de mono Cynomolgus

<400> 206

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

<210> 207
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursora de PH20 1-491

<400> 207

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

<210> 208

<211> 492

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> Precursora de PH20 1-492

<400> 208

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

<210> 209
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> Precursora de PH20 1-493

<400> 209

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

10

```

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

```

<210> 210

<211> 494

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursora de PH20 1-494

10

<400> 210

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

<210> 211

5 <211> 495

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> Precursora de PH20 1-495

<400> 211

```

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

```

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

<220>

<223> Precursora de PH20 1-496

<400> 212

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

<210> 213

<211> 497

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> Precursora de PH20 1-497

<400> 213

```

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

```

ES 2 727 137 T3

```

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

```

<210> 214
 <211> 498
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursora de PH20 1-498

10 <400> 214

```

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

```

```

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

```

<210> 215
 <211> 499
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursora de PH20 1-499

10 <400> 215

```

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

```

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

<210> 216
 <211> 500
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursora de PH20 1-500

10 <400> 216

```

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

```

<210> 217

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> humana (precursora de PH20) (1-509)

<400> 217

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

<210> 218

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

5 <220>
 <223> Hialuronidasa-1 [Precursora]

<400> 218

```

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

10

<210> 219
 <211> 473
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Hialuronidasa-2 [Precursora]

<400> 219

```

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

```

<210> 220

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hialuronidasa-3 [Precursora]

<400> 220

```

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

```

<210> 221

<211> 481

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hialuronidasa-4 [Precursora]

<400> 221

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

<210> 222
 <211> 793
 <212> PRT
 <213> Arthrobacter sp.

<220>
 <223> Hialuronano liasa (cepa FB24)

ES 2 727 137 T3

<400> 222

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

Ala	Ile	Asp	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	Ala	Gly	Arg	Leu	Thr	Val	Phe	Ser
			85						90					95	
Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Lys	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Thr	Thr	His	Thr	Arg
			100					105					110		
Leu	Ala	Thr	Met	Ala	Thr	Ala	Trp	Ala	Thr	Pro	Gly	Ser	Glu	His	Phe
		115					120					125			
Ala	Asp	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala
	130					135					140				
Asn	Ser	Leu	Cys	Tyr	Asn	Ala	Ser	Lys	Glu	Glu	Gln	Gly	Asn	Trp	Trp
145					150					155					160
Ser	Trp	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro	Lys	Ala	Leu	Ala	Asp	Thr	Met	Val	Leu
				165					170					175	
Leu	His	Ala	Glu	Leu	Thr	Ala	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Tyr	Cys	Ala	Ala
			180					185					190		
Ile	Asp	His	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Trp	Gln	Gln	Phe	Pro	Pro	Lys	Arg
	195						200					205			
Gly	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Asn	Arg	Val	Asp	Leu	Cys	Gln	Ala
	210					215					220				
Val	Thr	Ile	Arg	Ser	Leu	Val	Asp	Glu	Asp	Ala	Glu	Lys	Leu	Thr	His
225					230					235					240
Ala	Val	Ala	Gly	Leu	Ser	Glu	Val	Trp	Gln	Tyr	Val	Ser	Ala	Gly	Asn
				245					250					255	
Gly	Phe	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe	Ile	Gln	His	Ser	Thr	Thr	Pro	Tyr
			260					265					270		
Thr	Gly	Ser	Tyr	Gly	Val	Val	Leu	Leu	Thr	Gly	Leu	Ser	Lys	Leu	Phe
	275						280					285			
Ala	Leu	Leu	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Glu	Val	Ser	Asp	Pro	Ser	Arg	Asp
	290					295					300				
Ile	Leu	Phe	Lys	Thr	Val	Glu	Gly	Ser	Phe	Ala	Pro	Phe	Met	Val	Ala
305					310					315					320
Gly	Ala	Met	Ala	Asp	Ser	Val	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Glu	Ser
				325					330					335	
Asn	Thr	Gly	Phe	Asp	Leu	Gly	Ala	Ser	Thr	Ile	Glu	Ser	Ile	Leu	Leu
			340					345					350		
Leu	Ala	Arg	Ala	Val	Asp	Pro	Val	Thr	Ala	Arg	Arg	Trp	Arg	Ser	Leu
		355					360					365			
Cys	Leu	Ala	Trp	Ile	Asn	Gln	Asn	Arg	Lys	Ala	Pro	Ile	Leu	Ala	Asp
	370				375						380				
Ala	Gly	Val	Gly	Arg	Thr	Ala	Leu	Val	Lys	Glu	Leu	Leu	Ala	Met	Gly
	385				390					395					400
Leu	Thr	Glu	Thr	Asp	Leu	Pro	Gly	Gly	His	Tyr	Leu	Phe	Pro	Ala	Met
			405						410					415	
Asp	Arg	Thr	Met	His	His	Ser	Gln	Gly	Trp	Thr	Leu	Ser	Thr	Ala	Met
			420					425					430		
Ala	Ser	Ser	Arg	Ile	Ala	Trp	Tyr	Glu	Cys	Gly	Asn	Gly	Glu	Asn	Asn
		435				440						445			
Arg	Gly	Tyr	His	Thr	Gly	Ser	Gly	Met	Thr	Tyr	Val	Tyr	Asp	Gly	Asp
	450				455						460				
Leu	Gly	Gln	Tyr	Asp	Asp	Ala	Phe	Trp	Ala	Thr	Ala	Asn	His	Cys	Arg
465					470					475					480
Leu	Pro	Gly	Ile	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Glu
				485					490					495	
Gly	Glu	Trp	Gly	Ala	Ala	Thr	Pro	Ala	Asn	Glu	Trp	Thr	Gly	Ser	Thr
		500						505					510		
Ala	Tyr	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	Val	Gly	Gln	His	Leu	Ile	Gly	Pro	Gly
	515						520					525			
Gly	Thr	Gly	Leu	Thr	Ala	Arg	Lys	Ser	Trp	Phe	Val	Ser	Lys	Asp	Val
	530				535						540				
Ile	Val	Cys	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Arg	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Ile
545					550					555					560
Glu	Thr	Val	Val	Asp	His	Arg	Asn	Leu	His	Ala	Gly	Phe	Asn	Ala	Met
				565					570					575	
Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Gly	His	Pro	Glu	Val

ES 2 727 137 T3

[illegible]

<210> 223

<211> 557

5 <212> PRT

<213> Bdellovibrio bacteriovorus

$\langle 220 \rangle$

<223> hialuronano liasa

10

<400> 223

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

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

<210> 224
<211> 813
<212> PRT
<213> Propionibacterium acnes

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 224

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

50	Ala	Ile	Ile	Ala	Lys	Thr	Asp	Arg	Lys	Val	Ala	Glu	Ile	Leu	Thr	Asp
65	Leu	Val	Ser	Gly	Ser	Arg	Gln	Thr	Val	Leu	Ile	Ser	Ala	Asp	Leu	
				85					90					95		
	Arg	Lys	Glu	Gln	Ser	Pro	Phe	Ile	Thr	Lys	Thr	Ala	Arg	Ala	Ile	Glu
			100						105					110		
	Ser	Met	Ala	Cys	Ala	Trp	Ala	Thr	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	His	Lys	Asp
		115						120					125			
	Pro	Glu	Ile	Leu	Ser	Ala	Cys	Ile	Glu	Gly	Leu	Arg	Asp	Phe	Cys	Arg
		130					135					140				
	Leu	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ser	Gln	Asp	Glu	Tyr	Gly	Asn	Trp	Trp	Asp	Trp
145					150						155					160
	Glu	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Ala	Val	Ala	Asp	Val	Met	Cys	Ile	Leu	His
				165						170					175	
	Asp	Val	Leu	Pro	Pro	Glu	Val	Met	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Asp
			180						185					190		
	His	Phe	Ile	Pro	Asp	Pro	Trp	Phe	Gln	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Lys	Pro
		195						200					205			
	Thr	Ala	Asn	Pro	Val	Gln	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gly	Ala	Asn	Arg	Met
		210					215					220				
	Asp	Leu	Thr	Arg	Ala	Val	Met	Cys	Arg	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Asp	Glu
225					230					235						240
	Lys	Arg	Leu	Arg	His	Ala	Val	Asp	Gly	Leu	Pro	Asp	Ala	Trp	Arg	Val
				245					250						255	
	Thr	Thr	Glu	Gly	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Asp	Gly	Gly	Phe	Ile	Gln	His
			260						265					270		
	Ser	His	Ile	Pro	Tyr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Gly	Asp	Val	Leu	Phe	Ser	Gly
		275					280						285			
	Leu	Ala	Met	Leu	Phe	Pro	Leu	Val	Ser	Gly	Met	Arg	Phe	Asp	Ile	Val
		290					295					300				
	Glu	Ser	Ala	Arg	Lys	Ala	Phe	His	Asp	Gln	Val	Glu	Arg	Gly	Phe	Ile
305					310						315					320
	Pro	Val	Met	Tyr	Asn	Gly	Gln	Ile	Leu	Asp	Asp	Val	Arg	Gly	Arg	Ser
				325						330					335	
	Ile	Ser	Arg	Ile	Asn	Glu	Ser	Ala	Ala	Met	His	Gly	Ile	Ser	Ile	Ala
			340					345						350		
	Arg	Ala	Met	Leu	Met	Met	Ala	Asp	Ala	Leu	Pro	Thr	His	Arg	Ala	Glu
		355					360						365			
	Gln	Trp	Arg	Gly	Ile	Val	His	Gly	Trp	Met	Ala	Arg	Asn	Thr	Phe	Asp
		370					375					380				
	His	Leu	Ser	Glu	Pro	Ser	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Ser	Leu	Phe	Asp	Ala
385					390						395					400
	Ala	Ala	Lys	Ala	Arg	Pro	Val	Pro	Glu	Ser	Ser	Thr	Pro	Ser	Tyr	Phe
				405						410					415	
	Ala	Ser	Met	Asp	Arg	Leu	Val	His	Arg	Thr	Ala	Asp	Trp	Leu	Ile	Thr
			420						425					430		
	Val	Ser	Asn	Cys	Ser	Asp	Arg	Ile	Ala	Trp	Tyr	Glu	Tyr	Gly	Asn	Gly
		435					440						445			
	Glu	Asn	Glu	Trp	Ala	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln	Gly	Met	Arg	Tyr	Leu	Leu
		450					455					460				
	Leu	Pro	Gly	Asp	Met	Gly	Gln	Tyr	Glu	Asp	Gly	Tyr	Trp	Ala	Thr	Val
465					470						475					480
	Asp	Tyr	Ser	Ala	Pro	Thr	Gly	Thr	Thr	Val	Asp	Ser	Thr	Pro	Leu	Lys
				485						490					495	
	Arg	Ala	Val	Gly	Ala	Ser	Trp	Ala	Ala	Lys	Thr	Pro	Thr	Asn	Glu	Trp
			500						505					510		
	Ser	Gly	Gly	Leu	Ala	Ser	Gly	Ser	Trp	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	His	Ile
		515					520						525			
	Thr	Ser	Gln	Asp	Ser	Ala	Leu	Lys	Ala	Arg	Arg	Leu	Trp	Val	Gly	Leu
530					535							540				
	Lys	Asp	Ala	Met	Val	Glu	Leu	Thr	Thr	Asp	Val	Thr	Thr	Asp	Ala	Ser
545					550						555					560

Arg	Ala	Ile	Thr	Val	Val	Glu	His	Arg	Lys	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr		
				565					570					575			
Lys	Leu	Leu	Val	Asp	Gly	Asn	Arg	Val	Ser	Ser	Ala	Thr	Ser	Phe	Gln		
			580					585					590				
Asn	Pro	Arg	Trp	Ala	His	Leu	Asp	Gly	Val	Gly	Gly	Tyr	Val	Phe	Ala		
		595					600					605					
Thr	Asp	Thr	Asp	Leu	Ser	Ala	Asp	Val	Ala	Thr	Arg	Lys	Gly	Thr	Trp		
	610					615					620						
Ile	Asp	Val	Asn	Pro	Ser	Arg	Lys	Val	Lys	Gly	Ala	Asp	Glu	Val	Ile		
625				630						635					640		
Glu	Arg	Ala	Tyr	Ala	Ser	Leu	His	Val	Thr	His	His	Asp	Arg	Pro	Val		
				645				650						655			
Ala	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Ala	Ser	Arg	Ser	His	Thr	Met	Ala	Leu			
		660						665				670					
Ala	Thr	Arg	Pro	Gly	Val	Glu	Pro	Phe	Thr	Val	Leu	Arg	Asn	Asp	Ala		
		675					680					685					
Thr	Val	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Thr	Lys	Asp	Pro		
	690					695					700						
Thr	Val	Val	Thr	Thr	Leu	Ala	Phe	Trp	Lys	Pro	Ala	Thr	Cys	Gly	Gly		
705				710						715					720		
Val	Ala	Val	Asn	Arg	Pro	Ala	Leu	Val	Gln	Thr	Arg	Glu	Ser	Ala	Asn		
			725					730						735			
Gln	Met	Glu	Val	Ile	Val	Glu	Pro	Thr	Gln	Lys	Arg	Gly	Ser	Leu			
		740					745					750					
Thr	Val	Thr	Ile	Glu	Gly	Ser	Trp	Lys	Val	Lys	Thr	Ala	Asp	Ser	His		
		755				760					765						
Val	Asp	Val	Ser	Cys	Glu	Asn	Ala	Ala	Gly	Thr	Leu	His	Val	Asp	Thr		
	770					775					780						
Ala	Gly	Leu	Gly	Gly	Gln	Ser	Val	Arg	Val	Thr	Leu	Ala	Arg	Gln	Val		
785				790						795					800		
Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	His	Asp	Arg	Ala					
				805					810								

<210> 225
 <211> 1072
 5 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 225

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

Ala	Val	Thr	Gln	Lys	Val	Asn	Ile	Asp	Pro	Thr	Lys	Lys	Tyr	Glu	Val
				165					170					175	
Lys	Phe	Asp	Ile	Glu	Thr	Ser	Asn	Lys	Ala	Gly	Gln	Ala	Phe	Leu	Arg
				180				185						190	
Ile	Met	Glu	Lys	Lys	Asp	Asn	Asn	Thr	Arg	Leu	Trp	Leu	Ser	Glu	Met
		195					200					205			
Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Lys	His	Thr	Leu	Thr	Lys	Ile	Tyr	Asn	Pro
		210				215					220				
Lys	Leu	Asn	Val	Ser	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Gly
225					230					235					240
Thr	Gly	Ser	Ala	Thr	Phe	Asp	Asn	Ile	Ser	Met	Lys	Ala	Lys	Gly	Pro
				245					250					255	
Lys	Asp	Ser	Glu	His	Pro	Gln	Pro	Val	Thr	Thr	Gln	Ile	Glu	Glu	Ser
			260					265					270		
Val	Asn	Thr	Ala	Leu	Asn	Lys	Asn	Tyr	Val	Phe	Asn	Lys	Ala	Asp	Tyr
		275					280					285			
Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Ser	Leu	Gly	Lys	Ile	Val	Gly	Gly	Ile
		290				295					300				
Leu	Tyr	Pro	Asn	Ala	Thr	Gly	Ser	Thr	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Asp	Lys
305					310					315					320
Ser	Gly	Lys	Ile	Ile	Lys	Glu	Val	Pro	Leu	Ser	Val	Thr	Ala	Ser	Thr
				325					330					335	
Glu	Asp	Lys	Phe	Thr	Lys	Leu	Leu	Asp	Lys	Trp	Asn	Asp	Val	Thr	Ile
			340					345					350		
Gly	Asn	His	Val	Tyr	Asp	Thr	Asn	Asp	Ser	Asn	Met	Gln	Lys	Ile	Asn
		355					360					365			
Gln	Lys	Leu	Asp	Glu	Thr	Asn	Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Thr	Ile	Lys	Leu
		370				375					380				
Asp	Ser	Asn	His	Thr	Phe	Leu	Trp	Lys	Asp	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Asn
385					390				395						400
Ser	Ala	Gln	Leu	Thr	Ala	Thr	Tyr	Arg	Arg	Leu	Glu	Asp	Leu	Ala	Lys
			405						410					415	
Gln	Ile	Thr	Asn	Pro	His	Ser	Thr	Ile	Tyr	Lys	Asn	Glu	Lys	Ala	Ile
		420						425					430		
Arg	Thr	Val	Lys	Glu	Ser	Leu	Ala	Trp	Leu	His	Gln	Asn	Phe	Tyr	Asn
		435					440					445			
Val	Asn	Lys	Asp	Ile	Glu	Gly	Ser	Ala	Asn	Trp	Trp	Asp	Phe	Glu	Ile
		450				455					460				
Gly	Val	Pro	Arg	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Met	Asn	Asn	Tyr
465					470					475					480
Phe	Thr	Asp	Ala	Glu	Ile	Lys	Thr	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Glu	His	Phe
			485						490					495	
Val	Pro	Asp	Ala	Gly	Tyr	Phe	Arg	Lys	Thr	Leu	Asp	Asn	Pro	Phe	Lys
			500					505					510		
Ala	Leu	Gly	Gly	Asn	Leu	Val	Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys	Ile	Ile	Glu
		515					520					525			
Gly	Leu	Leu	Arg	Lys	Asp	Asn	Thr	Ile	Ile	Glu	Lys	Thr	Ser	His	Ser
		530				535					540				
Leu	Lys	Asn	Leu	Phe	Thr	Thr	Ala	Thr	Lys	Ala	Glu	Gly	Phe	Tyr	Ala
545					550					555					560
Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Thr	Asn	Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr
			565						570					575	
Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Thr	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile	Ile	Gln
		580					585						590		
Glu	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Gln	Glu	Leu	Asp	Met	Val	Tyr	Lys
		595					600					605			
Trp	Ile	Asn	Gln	Ser	Phe	Leu	Pro	Leu	Ile	Val	Lys	Gly	Glu	Leu	Met
		610				615					620				
Asp	Met	Ser	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser	His
625					630					635					640
Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gly	Phe	Leu	Arg	Leu	Ala	Asn	Met
			645						650					655	
Ser	Asn	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Ile	Lys	Thr	Ile

ES 2 727 137 T3

			660					665					670				
Ile	Thr	Ser	Asn	Lys	Phe	Tyr	Asn	Val	Phe	Asn	Asn	Leu	Lys	Ser	Tyr		
		675					680					685					
Ser	Asp	Ile	Ala	Asn	Met	Asn	Lys	Met	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Val	Ala		
	690					695				700							
Thr	Lys	Pro	Leu	Lys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Arg		
705					710					715					720		
Leu	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Lys	Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Leu	Ser	Leu		
				725					730						735		
His	Ser	Lys	Arg	Thr	Leu	Asn	Tyr	Glu	Gly	Met	Asn	Asp	Glu	Asn	Thr		
			740					745						750			
Arg	Gly	Trp	Tyr	Thr	Gly	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asp		
	755						760					765					
Gln	Ser	His	Tyr	Ser	Asn	His	Phe	Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Lys		
	770					775					780						
Met	Ala	Gly	Thr	Thr	Glu	Lys	Asp	Ala	Lys	Arg	Glu	Asp	Thr	Thr	Lys		
785					790					795					800		
Glu	Phe	Met	Ser	Lys	His	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Gln		
				805					810						815		
Val	Thr	Gly	Thr	Ser	Asp	Phe	Val	Gly	Ser	Val	Lys	Leu	Asn	Asp	His		
				820				825						830			
Phe	Ala	Leu	Ala	Ala	Met	Asp	Phe	Thr	Asn	Trp	Asp	Arg	Thr	Leu	Thr		
		835					840					845					
Ala	Gln	Lys	Gly	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val	Phe	Leu	Gly		
	850					855					860						
Ser	Asn	Ile	Lys	Asn	Thr	Asn	Gly	Ile	Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Thr	Ile		
865					870					875					880		
Asp	Gln	Arg	Lys	Asp	Ser	Lys	Thr	Pro	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Val	Asn			
				885				890						895			
Gly	Lys	Thr	Ile	Asp	Leu	Lys	Gln	Ala	Ser	Ser	Gln	Gln	Phe	Thr	Asp		
			900					905						910			
Thr	Lys	Ser	Val	Phe	Leu	Glu	Ser	Lys	Glu	Pro	Gly	Arg	Asn	Ile	Gly		
		915					920					925					
Tyr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asn	Ser	Thr	Ile	Asp	Ile	Glu	Arg	Lys	Glu	Gln		
					935						940						
Thr	Gly	Thr	Trp	Asn	Ser	Ile	Asn	Arg	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Ile		
945					950					955					960		
Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Ile	Thr	Ile	Ser	Gln	Lys	His	Asp	Asn	Lys	Gly		
				965					970					975			
Asp	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Met	Met	Val	Pro	Asn	Ile	Asp	Arg	Thr	Ser	Phe		
			980					985					990				
Asp	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser	Lys	Glu	Val	Glu	Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser		
		995					1000					1005					

<210> 226
<211> 1072
<212> PRT
<213> Streptococcus agalactiae 18RS21

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 226

Met Glu Ile Lys Lys Lys His Arg Ile Met Leu Tyr Ser Ala Leu Ile

ES 2 727 137 T3

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

Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Met Gly Arg Val Lys Ile Ile Glu
515 520 525
Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asn Thr Ile Ile Glu Lys Thr Ser His Ser
530 535 540
Leu Lys Asn Leu Phe Thr Thr Ala Thr Lys Ala Glu Gly Phe Tyr Ala
545 550 555 560
Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Thr Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr
565 570 575
Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu Thr Gln Leu Leu Pro Ile Ile Gln
580 585 590
Glu Thr Asp Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Glu Leu Asp Met Val Tyr Lys
595 600 605
Trp Ile Asn Gln Ser Phe Leu Pro Leu Ile Val Lys Gly Glu Leu Met
610 615 620
Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Glu Ala Ala Ser Ser His
625 630 635 640
Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Phe Leu Arg Leu Ala Asn Met
645 650 655
Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Asp Leu Ile Ser Thr Ile Lys Thr Ile
660 665 670
Ile Thr Ser Asn Lys Phe Tyr Asn Val Phe Asn Asn Leu Lys Ser Tyr
675 680 685
Ser Asp Ile Ala Asn Met Asn Lys Met Leu Asn Asp Ser Thr Val Ala
690 695 700
Thr Lys Pro Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr Phe Asn Ser Met Asp Arg
705 710 715 720
Leu Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Lys Asp Phe Gly Phe Ala Leu Ser Leu
725 730 735
His Ser Lys Arg Thr Leu Asn Tyr Glu Gly Met Asn Asp Glu Asn Thr
740 745 750
Arg Gly Trp Tyr Thr Gly Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp
755 760 765
Gln Ser His Tyr Ser Asn His Phe Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys
770 775 780
Met Ala Gly Thr Thr Glu Lys Asp Ala Lys Arg Glu Asp Thr Thr Lys
785 790 795 800
Glu Phe Met Ser Lys His Ser Lys Asp Ala Lys Glu Lys Thr Gly Gln
805 810 815
Val Thr Gly Thr Ser Asp Phe Val Gly Ser Val Lys Leu Asn Asp His
820 825 830
Phe Ala Leu Ala Ala Met Asp Phe Thr Asn Trp Asp Arg Thr Leu Thr
835 840 845
Ala Gln Lys Gly Trp Val Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly
850 855 860
Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn Gly Ile Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile
865 870 875 880
Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Tyr Thr Thr Tyr Val Asn
885 890 895
Gly Lys Thr Ile Asp Leu Lys Gln Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp
900 905 910
Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu Ser Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly
915 920 925
Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser Thr Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln
930 935 940
Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile Asn Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile
945 950 955 960
Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr Ile Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly
965 970 975
Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met Val Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe
980 985 990
Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys Glu Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser
995 1000 1005
Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp Lys Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile
1010 1015 1020
Lys His Asp Asn Gln Glu Ser Leu Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn
1025 1030 1035 1040
Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val Gln Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn
1045 1050 1055
Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr Met Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile
1060 1065 1070

<210> 227

5 <211> 1081

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae serotipo Ia

<220>

5 <223> Hialuronano liasa

<400> 227

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

[illegible]

ES 2 727 137 T3

```

Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn
865                               870 875                               880
Gly Val Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser
                               885 890                               895
Lys Thr Pro Tyr Thr Thr Tyr Val Asn Gly Lys Thr Val Asp Leu Lys
                               900 905                               910
Gln Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu
                               915 920                               925
Ser Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser
930                               935 940
Thr Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile
945                               950 955                               960
Asn Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr
                               965 970                               975
Ile Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met
                               980 985                               990
Val Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys
995                               1000 1005
Glu Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp
1010                               1015 1020
Lys Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile Lys His Asp Asn Gln Glu Ser
1025                               1030 1035                               1040
Leu Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val
                               1045 1050                               1055
Gln Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr
                               1060 1065                               1070
Met Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile
                               1075 1080

```

<210> 228

<211> 984

5 <212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae serotipo III

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 228

```

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

```

Tyr	Val	Phe	Asn	Lys	Ala	Asp	Tyr	Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Ser
	195					200					205				
Leu	Gly	Lys	Ile	Val	Gly	Gly	Ile	Leu	Tyr	Pro	Asn	Ala	Thr	Gly	Ser
	210				215						220				
Thr	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Asp	Lys	Ser	Gly	Lys	Ile	Ile	Lys	Glu	Val
225				230					235					240	
Pro	Leu	Ser	Val	Thr	Ala	Ser	Thr	Glu	Asp	Lys	Phe	Thr	Lys	Leu	Leu
			245					250						255	
Asp	Lys	Trp	Asn	Asp	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	His	Val	Tyr	Asp	Thr	Asn
	260							265					270		
Asp	Ser	Asn	Met	Gln	Lys	Ile	Asn	Gln	Lys	Leu	Asp	Glu	Thr	Asn	Ala
	275						280					285			
Lys	Asn	Ile	Lys	Thr	Ile	Lys	Leu	Asp	Ser	Asn	His	Thr	Phe	Leu	Trp
	290				295						300				
Lys	Asp	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Asn	Ser	Ala	Gln	Leu	Thr	Ala	Thr	Tyr
305					310				315						320
Arg	Arg	Leu	Glu	Asp	Leu	Ala	Lys	Gln	Ile	Thr	Asn	Pro	His	Ser	Thr
			325						330					335	
Ile	Tyr	Lys	Asn	Glu	Lys	Ala	Ile	Arg	Thr	Val	Lys	Glu	Ser	Leu	Ala
		340					345						350		
Trp	Leu	His	Gln	Asn	Phe	Tyr	Asn	Val	Asn	Lys	Asp	Ile	Glu	Gly	Ser
	355						360					365			
Ala	Asn	Trp	Trp	Asp	Phe	Glu	Ile	Gly	Val	Pro	Arg	Ser	Ile	Thr	Ala
	370				375						380				
Thr	Leu	Ala	Leu	Met	Asn	Asn	Tyr	Phe	Thr	Asp	Ala	Glu	Ile	Lys	Thr
385				390					395					400	
Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Glu	His	Phe	Val	Pro	Asp	Ala	Gly	Tyr	Phe	Arg
			405					410						415	
Lys	Thr	Leu	Asp	Asn	Pro	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Gly	Asn	Leu	Val	Asp
	420						425					430			
Met	Gly	Arg	Val	Lys	Ile	Ile	Glu	Gly	Leu	Leu	Arg	Lys	Asp	Asn	Thr
	435					440						445			
Ile	Ile	Glu	Lys	Thr	Ser	His	Ser	Leu	Lys	Asn	Leu	Phe	Thr	Thr	Ala
	450				455						460				
Thr	Lys	Ala	Glu	Gly	Phe	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Thr
465				470					475					480	
Asn	Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu
			485					490						495	
Thr	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile	Ile	Gln	Glu	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn
		500					505						510		
Gln	Glu	Leu	Asp	Met	Val	Tyr	Lys	Trp	Ile	Asn	Gln	Ser	Phe	Leu	Pro
	515						520					525			
Leu	Ile	Val	Lys	Gly	Glu	Leu	Met	Asp	Met	Ser	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile
	530				535						540				
Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser	His	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Leu	Arg
545				550					555					560	
Gly	Phe	Leu	Arg	Leu	Ala	Asn	Met	Ser	Asn	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu	Asp
			565					570					575		
Leu	Lys	Ser	Thr	Ile	Lys	Thr	Ile	Ile	Thr	Ser	Asn	Lys	Phe	Tyr	Asn
		580					585						590		
Val	Phe	Asn	Asn	Leu	Lys	Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Ala	Asn	Met	Asn	Lys
	595						600					605			
Met	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Val	Ala	Thr	Lys	Pro	Leu	Lys	Ser	Asn	Leu
	610				615						620				
Ser	Thr	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Arg	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Lys
625				630					635					640	
Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Leu	Ser	Leu	His	Ser	Lys	Arg	Thr	Leu	Asn	Tyr
			645					650						655	
Glu	Gly	Met	Asn	Asp	Glu	Asn	Thr	Arg	Asp	Trp	Tyr	Thr	Gly	Asp	Gly
	660						665					670			
Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asp	Gln	Ser	His	Tyr	Ser	Asn	His	Phe
	675					680						685			
Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Lys	Met	Ala	Gly	Thr	Thr	Glu	Lys	Asp

690	695	700
Ala Lys Arg Glu Asp Thr Thr Lys Glu Phe Met Ser Lys His Ser Lys		
705	710	715
Asp Ala Lys Glu Lys Thr Gly Gln Val Thr Gly Thr Ser Asp Phe Val		720
	725	730
Gly Ser Val Lys Leu Asn Asp His Phe Ala Leu Ala Ala Met Asp Phe		735
	740	745
Thr Asn Trp Asp Arg Thr Leu Thr Ala Gln Lys Gly Trp Val Ile Leu		750
	755	760
Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn Gly		765
	770	775
Ile Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser Lys		780
	785	790
Thr Pro Tyr Thr Thr Tyr Val Asn Gly Lys Thr Ile Asp Leu Lys Gln		800
	805	810
Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu Ser		815
	820	825
Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser Thr		830
	835	840
Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile Asn		845
	850	855
Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr Ile		860
	865	870
Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met Val		875
	885	890
Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys Glu		895
	900	905
Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp Lys		910
	915	920
Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile Lys His Asp Asn Gln Glu Ser Leu		925
	930	935
Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val Gln		940
	945	950
Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr Met		955
	965	970
Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile		975
	980	

<210> 229
 <211> 807
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa COL)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 229

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

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

Leu	Glu	Ser	Thr	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	Asn
625					630					635					640
Lys	Pro	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	Lys
				645					650						655
Glu	Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Asp	Thr	Gln	Lys	Thr	Asp	Glu	Tyr	Tyr
			660					665					670		
Glu	Val	Thr	Gln	Lys	His	Ser	Asn	Ser	Asp	Asn	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Val
		675					680					685			
Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Asp	Val	Phe	Lys	Thr	Lys	Lys	Asp	Glu
	690					695					700				
Val	Thr	Val	Val	Lys	Gln	Glu	Asp	Asp	Phe	His	Val	Val	Lys	Asp	Asn
705					710					715					720
Glu	Ser	Val	Trp	Ala	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Asn	Ser	Thr	Gln	Thr	Phe
				725					730					735	
Asp	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Gly	Met	Phe	Ile
			740				745						750		
Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Asp	Asn	Thr	Tyr	Glu	Cys	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro
		755					760					765			
Glu	Ser	Thr	Asn	Ser	Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Ile	Ser	Met	Thr
	770					775					780				
Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly
785					790					795					800
Val	His	Phe	Glu	Leu	Thr	Lys									
				805											

<210> 230

<211> 420

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (cepa MRSA252)

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 230

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

```

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

```

<210> 231
 <211> 806
 5 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa MRSA252)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

10 <400> 231

```

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

```

Asp	Glu	Met	Lys	Asn	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Thr	Tyr	Ala	Pro	Ser
210						215				220					
Ser	Asp	Lys	Ile	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	Glu	Ser	Glu	Asp	Ala	Lys	Gly
225					230					235					240
Gly	Asn	Leu	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Val	Ile
				245					250						255
Glu	Glu	Asp	Val	Asp	Met	Leu	Lys	Lys	Ser	Ile	Asp	Ser	Phe	Asn	Lys
			260					265						270	
Val	Phe	Thr	Tyr	Val	Gln	Asp	Ser	Ala	Thr	Gly	Lys	Gly	Arg	Asn	Gly
			275				280					285			
Phe	Tyr	Lys	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Gln	Asp	Val	Pro	Tyr	Thr
	290					295					300				
Gly	Ala	Tyr	Gly	Val	Val	Leu	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser	Gln	Met	Met	Pro
305					310					315					320
Met	Ile	Lys	Glu	Ser	Pro	Phe	Lys	Thr	Thr	Gln	Asp	Asn	Ala	Thr	Leu
				325					330					335	
Ser	Asn	Trp	Ile	Asp	Glu	Gly	Phe	Met	Pro	Leu	Ile	Tyr	Lys	Gly	Glu
		340						345						350	
Met	Met	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Ala	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Glu	Thr
		355					360					365			
Ser	His	Thr	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Asn
		370				375					380				
Asp	Thr	Met	Asp	Asp	Ser	Thr	Lys	Thr	Arg	Tyr	Lys	Gln	Ile	Val	Lys
385					390					395					400
Thr	Ser	Val	Asn	Ser	Asp	Ser	Ser	Tyr	Asn	Gln	Asn	Asn	Tyr	Leu	Asn
			405						410					415	
Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Ala	Lys	Met	Lys	Lys	Leu	Met	Asn	Asp	Ser	Thr
			420					425					430		
Ile	Ser	Lys	Asn	Asp	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp	Met
		435					440					445			
Asp	Arg	Val	Thr	Tyr	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu
	450					455					460				
Ser	Met	Thr	Ser	Lys	Asn	Ile	Ala	Arg	Tyr	Glu	Asn	Ile	Asn	Gly	Glu
465					470					475					480
Asn	Leu	Lys	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Asn
				485					490					495	
Ser	Asp	Val	Lys	His	Tyr	Arg	Asp	Asn	Phe	Trp	Ala	Thr	Ala	Asp	Met
		500						505					510		
Thr	Cys	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Asn	Asp	Met	Pro	Ser	Thr	Asn
		515						520					525		
Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Ser	Phe	Val	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Asn	Asn	Lys
		530				535					540				
Tyr	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Leu	Thr
545					550					555					560
Ala	Lys	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val	Phe	Leu	Gly
				565					570					575	
Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro	Val	Thr	Ser	Val
			580					585					590		
Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Lys	Leu	Phe	Lys	Asp	Asp	Ile	Glu
		595				600						605			
Ile	Thr	Thr	Ser	Asp	Val	Asn	Ala	Gln	Glu	Thr	His	Ser	Val	Phe	Leu
		610				615						620			
Glu	Ser	Asn	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	Asp	Lys
625					630					635					640
Pro	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	Ser	Glu
				645					650					655	
Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Lys	Asp	Asp	Lys	Lys	Asp	Glu	Tyr	Tyr	Glu
			660					665					670		
Val	Thr	Gln	Thr	His	Asn	Thr	Ser	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Val	Leu
		675						680					685		
Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Ser	Asp	Phe	Lys	Ser	Lys	Asn	Asn	Asn	Val
		690				695					700				
Ser	Ile	Val	Lys	Gln	Asp	Glu	Asp	Phe	His	Val	Ile	Lys	Asp	Asn	Asp

705					710					715				720	
Gly	Val	Phe	Ala	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asn	Thr	Lys	Ser	Phe	Asp
				725					730					735	
Ile	Asn	Gly	Ile	Thr	Val	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Gly	Met	Phe	Val	Ile
				740					745				750		
Lys	Lys	Lys	Asp	Asp	Lys	Ala	Tyr	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro	Glu
			755				760				765				
Thr	Thr	Asn	Thr	Ala	Ser	Asn	Ile	Glu	Ser	Lys	Ile	Phe	Ile	Lys	Gly
			770			775					780				
Tyr	Thr	Ile	Thr	Asn	Lys	Ser	Val	Ile	Asn	Ser	Asn	Asp	Ala	Gly	Val
785					790					795					800
Asn	Phe	Glu	Leu	Thr	Lys										
					805										

<210> 232

<211> 815

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (cepa MSSA476)

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 232

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

305	Ile	Lys	Glu	Thr	Pro	310	Phe	Asn	Asp	Lys	Thr	315	Gln	Asn	Asp	Thr	Thr	Leu	320
					325							330						335	
Lys	Ser	Trp	Ile	Asp	Asp	Gly	Phe	Met	Pro	Leu	Ile	Tyr	Lys	Gly	Glu				
			340					345						350					
Met	Met	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Ala	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Glu	Thr				
		355					360							365					
Ser	His	Thr	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Ser				
		370					375							380					
Asp	Ala	Met	Asp	Asp	Ser	Thr	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Gln	Ile	Val	Lys				
		385					390							400					
Thr	Ser	Val	Lys	Ser	Asp	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Asp	Thr	Leu	Ser				
					405									415					
Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Ser	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Met	Glu	Asp	Ser	Thr				
			420					425						430					
Ile	Ser	Thr	Asn	Gly	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp	Met				
		435						440						445					
Asp	Arg	Val	Thr	Tyr	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu				
		450						455						460					
Ser	Met	Thr	Ser	Lys	Asn	Val	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ser	Ile	Asn	Gly	Glu				
		465						470						475					
Asn	Leu	Lys	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Asn				
					485									490					
Ser	Asp	Val	Lys	His	Tyr	Arg	Asp	Asn	Phe	Trp	Ala	Thr	Ala	Asp	Met				
					500									510					
Lys	Arg	Leu	Ala	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Glu	Glu	Pro	Lys	Gly				
		515						520						525					
Thr	Asp	Val	Lys	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Phe	Val	Gly	Gly	Thr	Lys	Phe				
		530						535						540					
Asp	Asp	Gln	His	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Asp	Lys				
					550									555					
Thr	Leu	Thr	Ala	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val					
					565									570					
Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro	Val				
					580									590					
Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Thr	Asp				
		595												605					
Asp	Lys	Gln	Thr	Thr	Ala	Ser	Asp	Asn	Gln	Gly	Thr	Asn	Ser	Val	Phe				
					615									620					
Leu	Glu	Ser	Thr	Asn	Lys	Pro	Lys	Asn	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu				
					630									635					
Asn	Glu	Ser	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp				
					645									650					
Ser	Asp	Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Gln	Asp	Ser	Lys	Thr	Asn	Gln	Tyr				
					660									665					
Tyr	Glu	Val	Thr	Gln	Lys	His	Ser	Asn	Thr	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Tyr				
		675												680					
Val	Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Asp	Asp	Phe	Asn	Thr	Lys	Lys	Asp				
		690												700					
Lys	Val	Thr	Val	Val	Lys	Gln	Asp	Asp	Asp	Phe	His	Val	Val	Lys	Asp				
					710									715					
Asn	Glu	Ser	Val	Trp	Ala	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Asp	Ser	Thr	Gln	Thr				
					725									730					
Phe	Ile	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Gly	Met	Phe				
					740									745					
Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Asp	Lys	Thr	Tyr	Glu	Cys	Ser	Phe	Tyr	Asn					
					755									760					
Pro	Glu	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Ile	Ser	Met				
					770									775					
Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser				
					785									790					
Gly	Val	Arg	Phe	Glu	Leu	Gln	Gln	Thr	Leu	Asn	Lys	Asp	Asp	Asn					
					805									810					

<210> 233
 <211> 807
 5 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa NCTC 8325)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 233

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

ES 2 727 137 T3

Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Asp	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Met	Thr	Asp	Asn	Ser
			420					425					430		
Ile	Ser	Lys	Asn	Gly	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp	Met
		435					440						445		
Asp	Arg	Val	Thr	Tyr	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu
	450					455					460				
Ser	Met	Thr	Ser	Lys	Asn	Val	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ser	Ile	Asn	Gly	Glu
	465				470					475					480
Asn	Leu	Lys	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Asn
			485						490					495	
Ser	Asp	Val	Lys	His	Tyr	His	Asp	Asn	Phe	Trp	Val	Thr	Ala	Asp	Met
		500					505						510		
Lys	Arg	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Asp	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	Asp
	515						520					525			
Thr	Asp	Asp	Lys	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Phe	Val	Gly	Gly	Thr	Lys	Val
	530					535					540				
Asp	Asp	Gln	His	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Asp	Lys
	545				550					555					560
Thr	Leu	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val
			565					570						575	
Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro	Val
		580					585						590		
Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Thr	Asp
	595					600						605			
Asp	Lys	Gln	Thr	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Gln	Glu	Asn	Asn	Ser	Val	Phe
	610				615						620				
Leu	Glu	Ser	Thr	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	Asn
	625				630					635					640
Lys	Pro	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	Lys
			645					650						655	
Glu	Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Asp	Thr	Gln	Lys	Thr	Asp	Glu	Tyr	Tyr
		660					665						670		
Glu	Val	Thr	Gln	Lys	His	Ser	Asn	Ser	Asp	Asn	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Val
	675					680						685			
Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Asp	Val	Phe	Lys	Thr	Lys	Lys	Asp	Glu
	690				695						700				
Val	Thr	Val	Val	Lys	Gln	Glu	Asp	Asp	Phe	His	Val	Val	Lys	Asp	Asn
	705				710					715					720
Glu	Ser	Val	Trp	Ala	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Asn	Ser	Thr	Gln	Thr	Phe
			725					730					735		
Asp	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Gly	Met	Phe	Ile
		740					745						750		
Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Asp	Asn	Thr	Tyr	Glu	Cys	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro
		755				760						765			
Glu	Ser	Thr	Asn	Ser	Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Ile	Ser	Met	Thr
	770					775					780				
Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly
	785				790					795					800
Val	His	Phe	Glu	Leu	Thr	Lys									
						805									

<210> 234

<211> 809

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (cepa bovina RF122)

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 234

Met	Thr	Tyr	Arg	Met	Lys	Lys	Trp	Gln	Lys	Leu	Ser	Thr	Ile	Thr	Leu
1				5					10					15	

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

[illegible]

<210> 235
<211> 807
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus (cepa bovina RF122)

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 235

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

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

Leu	Glu	Ser	Asn	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	Asp
625					630					635					640
Lys	Pro	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	Ser
				645					650						655
Glu	Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Thr	Asp	Asp	Lys	Lys	Asp	Glu	Tyr	Tyr
			660					665					670		
Glu	Val	Thr	Gln	Thr	His	Asn	Thr	Ser	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Val
		675					680					685			
Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Ser	Asp	Phe	Lys	Ser	Lys	Asn	Asn	Asn
690						695					700				
Val	Ser	Ile	Val	Lys	Gln	Asp	Glu	Asp	Phe	His	Val	Ile	Lys	Asp	Asn
705					710					715					720
Asp	Gly	Val	Phe	Ala	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Asp	Ser	Thr	Lys	Ser	Phe
				725					730						735
Asp	Ile	Asn	Gly	Thr	Ile	Val	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Gly	Met	Phe	Val
			740				745						750		
Ile	Lys	Lys	Lys	Asp	Asp	Asn	Thr	Tyr	Glu	Cys	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro
		755					760					765			
Thr	Ser	Thr	Asn	Ser	Thr	Ser	Asn	Lys	Glu	Ser	Lys	Ile	Ser	Val	Thr
	770					775					780				
Gly	Tyr	Thr	Ile	Thr	Asn	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Phe	Lys	Glu	Ser	Asp
785					790					795					800
Ile	His	Phe	Glu	Leu	Thr	Lys									
				805											

<210> 236

<211> 807

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (cepa USA300)

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 236

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

Asp	Lys	Ile	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	Lys	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Gly	Gly
225					230				235						240
Asn	Leu	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Cys	Ile	Ile	Glu
				245					250						255
Glu	Asp	Lys	Asp	Met	Met	Lys	Lys	Ser	Ile	Asp	Ser	Phe	Asn	Lys	Val
			260					265					270		
Phe	Thr	Tyr	Val	Gln	Asp	Ser	Ala	Thr	Gly	Lys	Glu	Arg	Asn	Gly	Phe
		275					280					285			
Tyr	Lys	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Gln	Asp	Val	Pro	Tyr	Thr	Gly
	290					295					300				
Ala	Tyr	Gly	Val	Val	Leu	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser	Gln	Met	Met	Pro	Met
305					310					315					320
Ile	Lys	Glu	Thr	Pro	Phe	Asn	Asp	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Thr	Thr	Leu
				325					330					335	
Lys	Ser	Trp	Ile	Asp	Asp	Gly	Phe	Met	Pro	Leu	Ile	Tyr	Lys	Gly	Glu
			340					345					350		
Met	Met	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Ala	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Glu	Thr
		355					360					365			
Ser	His	Ser	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Ser
	370					375					380				
Asp	Ala	Met	Asp	Asp	Ser	Thr	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Lys	Ile	Val	Lys
385					390					395					400
Ser	Ser	Val	Glu	Ser	Asp	Ser	Ser	Tyr	Lys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asn
				405					410					415	
Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Asp	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Met	Thr	Asp	Asn	Ser
		420						425					430		
Ile	Ser	Lys	Asn	Gly	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp	Met
		435					440						445		
Asp	Arg	Val	Thr	Tyr	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu
	450					455					460				
Ser	Met	Thr	Ser	Lys	Asn	Val	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ser	Ile	Asn	Gly	Glu
465					470					475					480
Asn	Leu	Lys	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Asn
			485						490					495	
Ser	Asp	Val	Lys	His	Tyr	His	Asp	Asn	Phe	Trp	Val	Thr	Ala	Asp	Met
		500						505					510		
Lys	Arg	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Asp	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	Asp
		515					520						525		
Thr	Asp	Asp	Lys	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Phe	Val	Gly	Gly	Thr	Lys	Val
		530				535					540				
Asp	Asp	Gln	His	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Asp	Lys
545					550					555					560
Thr	Leu	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val
				565					570					575	
Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro	Val
			580					585					590		
Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Thr	Asp
		595					600					605			
Asp	Lys	Gln	Thr	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Gln	Glu	Asn	Asn	Ser	Val	Phe
					615						620				
Leu	Glu	Ser	Thr	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	Asn
625					630					635					640
Lys	Pro	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	Lys
				645					650					655	
Glu	Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Asp	Thr	Gln	Lys	Thr	Asp	Glu	Tyr	Tyr
			660					665					670		
Glu	Val	Thr	Gln	Lys	His	Ser	Asn	Ser	Asp	Asn	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Val
		675					680					685			
Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Asp	Val	Phe	Lys	Thr	Lys	Lys	Asp	Glu
		690				695					700				
Val	Thr	Val	Val	Lys	Gln	Glu	Asp	Asp	Phe	His	Val	Val	Lys	Asp	Asn
705					710					715					720
Glu	Ser	Val	Trp	Ala	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Asn	Ser	Thr	Gln	Thr	Phe

ES 2 727 137 T3

Asp	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Gly	Met	Phe	Ile
725				730				735							
740				745				750							
Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Asp	Asn	Thr	Tyr	Glu	Cys	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro
755				760				765							
Glu	Ser	Thr	Asn	Ser	Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Ile	Ser	Met	Thr
770				775				780							
Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly
785				790				795				800			
Val	His	Phe	Glu	Leu	Thr	Lys									
805															

<210> 237

<211> 1066

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

$\langle 220 \rangle$

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 237

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

					325					330					335
Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Leu	Trp	Glu	Lys	Phe	Ser	Asn	Tyr	Lys	Thr	Ser
			340					345					350		
Ala	Asn	Leu	Thr	Ala	Thr	Tyr	Arg	Lys	Leu	Glu	Glu	Met	Ala	Lys	Gln
		355					360					365			
Val	Thr	Asn	Pro	Ser	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Gln	Asp	Glu	Thr	Val	Val	Arg
	370					375					380				
Thr	Val	Arg	Asp	Ser	Met	Glu	Trp	Met	His	Lys	His	Val	Tyr	Asn	Ser
385					390					395					400
Glu	Lys	Ser	Ile	Val	Gly	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro
			405						410					415	
Arg	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu	Met	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ser	Asp
			420					425					430		
Glu	Glu	Ile	Lys	Lys	Tyr	Thr	Asp	Val	Ile	Glu	Lys	Phe	Val	Pro	Asp
		435					440					445			
Pro	Glu	His	Phe	Arg	Lys	Thr	Thr	Asp	Asn	Pro	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly
	450					455					460				
Gly	Asn	Leu	Val	Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Leu
465					470					475					480
Arg	Lys	Asp	Asp	Gln	Glu	Ile	Ser	Ser	Thr	Ile	Arg	Ser	Ile	Glu	Gln
				485					490					495	
Val	Phe	Lys	Leu	Val	Asp	Gln	Gly	Glu	Gly	Phe	Tyr	Gln	Asp	Gly	Ser
			500					505					510		
Tyr	Ile	Asp	His	Thr	Asn	Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val
	515					520					525				
Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Gln	Lys	Thr	Lys
	530					535					540				
Asn	Pro	Ile	Asp	Lys	Asp	Lys	Met	Gln	Thr	Met	Tyr	His	Trp	Ile	Asp
545					550					555					560
Lys	Ser	Phe	Ala	Pro	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Glu	Leu	Met	Asp	Met	Ser
				565					570					575	
Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Ala	Asn	Ser	Glu	Gly	His	Val	Ala	Ala
			580					585					590		
Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gly	Ile	His	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu	Gly
	595					600					605				
Glu	Thr	Lys	Gln	Cys	Leu	Gln	Ser	Leu	Val	Lys	Thr	Ile	Val	Gln	Ser
	610					615					620				
Asp	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Val	Phe	Lys	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	Lys	Asp	Ile
625					630					635					640
Ser	Leu	Met	Gln	Ser	Leu	Leu	Ser	Asp	Ala	Gly	Val	Ala	Ser	Val	Pro
				645					650					655	
Arg	Pro	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ala	Phe	Asn	Lys	Met	Asp	Lys	Thr	Ala	Met
			660					665					670		
Tyr	Asn	Ala	Glu	Lys	Gly	Phe	Gly	Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Ser
	675														

ES 2 727 137 T3

Ala	Ser	Leu	Thr	Glu	Gln	Glu	Lys	Asp	Tyr	Pro	Glu	Thr	Gln	Ser	Val
		835					840					845			
Phe	Leu	Glu	Ser	Phe	Asp	Ser	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	Phe	Phe	Phe
	850					855					860				
Lys	Lys	Ser	Ser	Ile	Ser	Met	Ser	Lys	Ala	Leu	Gln	Lys	Gly	Ala	Trp
865					870					875					880
Lys	Asp	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Ser	Asp	Lys	Glu	Val	Glu	Asn	Glu	Phe
				885					890					895	
Leu	Thr	Ile	Ser	Gln	Ala	His	Lys	Gln	Asn	Arg	Asp	Ser	Tyr	Gly	Tyr
		900						905					910		
Met	Leu	Ile	Pro	Asn	Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Phe	Asn	Gln	Met	Ile	Lys
	915					920						925			
Glu	Leu	Glu	Ser	Ser	Leu	Ile	Glu	Asn	Asn	Glu	Thr	Leu	Gln	Ser	Val
	930					935					940				
Tyr	Asp	Ala	Lys	Gln	Gly	Val	Trp	Gly	Ile	Val	Lys	Tyr	Asp	Asp	Ser
945					950					955					960
Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Asn	Gln	Phe	Gln	Val	Leu	Lys	Arg	Gly	Val	Tyr
				965					970					975	
Thr	Ile	Arg	Lys	Glu	Gly	Asp	Glu	Tyr	Lys	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Pro
		980						985					990		
Glu	Thr	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Asp	Gln	Glu	Val	Phe	Lys	Lys	Leu	Glu
		995					1000					1005			
Gln	Ala	Ala	Gln	Pro	Gln	Val	Gln	Asn	Ser	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser
	1010					1015					1020				
Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	His	Ser	Asp	Gln	Lys	Asn	Leu	Pro	Gln	Thr	Gly
1025					1030					1035					1040
Glu	Gly	Gln	Ser	Ile	Leu	Ala	Ser	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala
				1045					1050					1055	
Phe	Tyr	Leu	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Asn	Asn						
			1060					1065							

<210> 238
 <211> 1078
 5 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae (cepa ATCC BAA-255/R6)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

10 <400> 238

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

Thr	Lys	Asp	Trp	Gln	Thr	Ile	Glu	Ala	Asp	Tyr	Ser	Pro	Thr	Leu	Asp
		180						185					190		
Val	Asp	Lys	Ile	Lys	Leu	Glu	Leu	Phe	Tyr	Glu	Thr	Gly	Thr	Gly	Thr
		195					200					205			
Val	Ser	Phe	Lys	Asp	Ile	Glu	Leu	Val	Glu	Val	Ala	Asp	Gln	Pro	Ser
		210				215					220				
Glu	Asp	Ser	Gln	Thr	Asp	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Asp	Leu	Pro
225					230					235				240	
Ile	Gly	Lys	Lys	His	Val	Phe	Ser	Leu	Ala	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Val
				245					250					255	
Glu	Asn	Pro	Asp	Val	Ala	Ser	Val	Lys	Asn	Gly	Ile	Leu	Glu	Pro	Leu
			260					265					270		
Lys	Glu	Gly	Thr	Thr	Asn	Val	Ile	Val	Ser	Lys	Asp	Gly	Lys	Glu	Val
		275					280					285			
Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Lys	Ile	Leu	Ala	Ser	Val	Lys	Asp	Thr	Tyr	Thr
		290				295					300				
Asp	Arg	Leu	Asp	Asp	Trp	Asn	Gly	Ile	Ile	Ala	Gly	Asn	Gln	Tyr	Tyr
305					310					315				320	
Asp	Ser	Lys	Asn	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Leu	Asn	Gln	Glu	Leu	Glu	Gly
				325					330					335	
Lys	Val	Ala	Asp	Ser	Leu	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Asp	Arg	Ile
		340						345					350		
Tyr	Leu	Trp	Glu	Lys	Phe	Ser	Asn	Tyr	Lys	Thr	Ser	Ala	Asn	Leu	Thr
		355					360					365			
Ala	Thr	Tyr	Arg	Lys	Leu	Glu	Glu	Met	Ala	Lys	Gln	Val	Thr	Asn	Pro
		370				375					380				
Ser	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Gln	Asp	Glu	Thr	Val	Val	Arg	Thr	Val	Arg	Asp
385					390					395				400	
Ser	Met	Glu	Trp	Met	His	Lys	His	Val	Tyr	Asn	Ser	Glu	Lys	Ser	Ile
				405					410					415	
Val	Gly	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala	Ile	Asn
		420						425					430		
Asn	Thr	Leu	Ser	Leu	Met	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ser	Asp	Glu	Glu	Ile	Lys
		435					440					445			
Lys	Tyr	Thr	Asp	Val	Ile	Glu	Lys	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Glu	His	Phe
		450				455					460				
Arg	Lys	Thr	Thr	Asp	Asn	Pro	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Gly	Asn	Leu	Val
465					470					475				480	
Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Leu	Arg	Lys	Asp	Asp
				485					490					495	
Gln	Glu	Ile	Ser	Ser	Thr	Ile	Arg	Ser	Ile	Glu	Gln	Val	Phe	Lys	Leu
			500					505					510		
Val	Asp	Gln	Gly	Glu	Gly	Phe	Tyr	Gln	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His
		515					520					525			
Thr	Asn	Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asp	Gly
		530				535					540				
Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Gln	Lys	Thr	Lys	Asn	Pro	Ile	Asp
545					550					555				560	
Lys	Asp	Lys	Met	Gln	Thr	Met	Tyr	His	Trp	Ile	Asp	Lys	Ser	Phe	Ala
			565						570					575	
Pro	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Glu	Leu	Met	Asp	Met	Ser	Arg	Gly	Arg	Ser
			580					585					590		
Ile	Ser	Arg	Ala	Asn	Ser	Glu	Gly	His	Val	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Leu
		595					600					605			
Arg	Gly	Ile	His	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu	Gly	Glu	Thr	Lys	Gln
		610				615					620				
Arg	Leu	Gln	Ser	Leu	Val	Lys	Thr	Ile	Val	Gln	Ser	Asp	Ser	Tyr	Tyr
625					630					635				640	
Asp	Val	Phe	Lys	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ser	Leu	Met	Gln
			645						650					655	
Ser	Leu	Leu	Ser	Asp	Ala	Gly	Val	Ala	Ser	Val	Pro	Arg	Thr	Ser	Tyr
			660					665				670			
Leu	Ser	Ala	Phe	Asn	Lys	Met	Asp	Lys	Thr	Ala	Met	Tyr	Asn	Ala	Glu

Lys	Gly	Phe	Gly	Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Ser	Arg	Thr	Leu	Asn	
	690					695					700					
Tyr	Glu	His	Met	Asn	Lys	Glu	Asn	Lys	Arg	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ser	Asp	
705					710					715					720	
Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Gly	Asp	Leu	Ser	His	Tyr	Ser	Asp	Gly	
				725					730					735		
Tyr	Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Lys	Met	Pro	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	
			740					745					750			
Asp	Ala	Lys	Arg	Ala	Asp	Ser	Asp	Thr	Gly	Lys	Val	Leu	Pro	Ser	Ala	
	755						760					765				
Phe	Val	Gly	Thr	Ser	Lys	Leu	Asp	Asp	Ala	Asn	Ala	Thr	Ala	Thr	Met	
	770					775					780					
Asp	Phe	Thr	Asn	Trp	Asn	Gln	Thr	Leu	Thr	Ala	His	Lys	Ser	Trp	Phe	
785					790					795					800	
Met	Leu	Lys	Asp	Lys	Ile	Ala	Phe	Leu	Gly	Ser	Asn	Ile	Gln	Asn	Thr	
				805					810					815		
Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Ile	Asp	Gln	Arg	Lys	Leu	Glu	Ser	
			820					825					830			
Ser	Asn	Pro	Tyr	Lys	Val	Tyr	Val	Asn	Asp	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Thr	
	835						840					845				
Glu	Gln	Glu	Lys	Asp	Tyr	Pro	Glu	Thr	Gln	Ser	Val	Phe	Leu	Glu	Ser	
	850					855					860					
Ser	Asp	Ser	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	Phe	Phe	Phe	Lys	Lys	Ser	Ser	
865					870					875					880	
Ile	Ser	Met	Ser	Lys	Ala	Leu	Gln	Lys	Gly	Ala	Trp	Lys	Asp	Ile	Asn	
				885					890					895		
Glu	Gly	Gln	Ser	Asp	Lys	Glu	Val	Glu	Asn	Glu	Phe	Leu	Thr	Ile	Ser	
			900					905					910			
Gln	Ala	His	Lys	Gln	Asn	Gly	Asp	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Met	Leu	Ile	Pro	
	915						920					925				
Asn	Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Phe	Asn	Gln	Met	Ile	Lys	Glu	Leu	Glu	Ser	
	930					935					940					
Ser	Leu	Ile	Glu	Asn	Asn	Glu	Thr	Leu	Gln	Ser	Val	Tyr	Asp	Ala	Lys	
945				950						955					960	
Gln	Gly	Val	Trp	Gly	Ile	Val	Lys	Tyr	Asp	Asp	Ser	Val	Ser	Thr	Ile	
				965					970					975		
Ser	Asn	Gln	Phe	Gln	Val	Leu	Lys	Arg	Gly	Val	Tyr	Thr	Ile	Arg	Lys	
			980					985				990				
Glu	Gly	Asp	Glu	Tyr	Lys	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Glu	Thr	Gln	Glu	
	995						1000					1005				
Ser	Ala	Pro	Asp	Gln	Glu	Val	Phe	Lys	Lys	Leu	Glu	Gln	Ala	Ala	Gln	
	1010					1015										

<210> 239
<211> 1067
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae serotipo 2 (cepa D39/N)

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 239

Met Gln Thr Lys Thr Lys Lys Leu Ile Val Ser Leu Ser Ser Leu Val

ES 2 727 137 T3

1	5	10	15
Leu Ser Gly Phe Leu Leu Asn His Tyr Met Thr Val Gly Ala Glu Glu			
Thr Thr Thr 20 Thr Ile Gln Gln Ser Gln Lys Glu Val Gln Tyr Gln			
Gln Arg Asp Thr Lys Asn Leu Val Glu Asn Gly Asp Phe Gly Gln Thr			
Glu Asp Gly Ser Ser Pro Trp Thr Gly Ser Lys Ala Gln Gly Trp Ser			
Ala Trp Val Asp Gln Lys Asn Ser Ser Ala Asp Ala Ser Thr Arg Val			
Ile Glu Ala Lys Asp Gly Ala Ile Thr Ile Ser Ser Pro Glu Lys Leu			
Arg Ala Ala Val His Arg Met Val Pro Ile Glu Ala Lys Lys Lys Tyr			
Lys Leu Arg Phe Lys Ile Lys Thr Asp Asn Lys Val Gly Ile Ala Lys			
Val Arg Ile Ile Glu Glu Ser Gly Lys Asp Lys Arg Leu Trp Asn Ser			
Ala Thr Thr Ser Gly Thr Lys Asp Trp Gln Thr Ile Glu Ala Asp Tyr			
Ser Pro Thr Leu Asp Val Asp Lys Ile Lys Leu Glu Leu Phe Tyr Glu			
Thr Gly Thr Gly Thr Val Ser Phe Lys Asp Ile Glu Leu Val Glu Val			
Ala Asp Gln Pro Ser Glu Asp Ser Gln Thr Asp Lys Gln Leu Glu Glu			
Lys Ile Asp Leu Pro Ile Gly Lys Lys His Val Phe Ser Leu Ala Asp			
Tyr Thr Tyr Lys Val Glu Asn Pro Asp Val Ala Ser Val Lys Asn Gly			
Ile Leu Glu Pro Leu Lys Glu Gly Thr Thr Asn Val Ile Val Ser Lys			
Asp Gly Lys Glu Val Lys Lys Ile Pro Leu Lys Ile Leu Ala Ser Val			
Lys Asp Thr Tyr Thr Asp Arg Leu Asp Asp Trp Asn Gly Ile Ile Ala			
Gly Asn Gln Tyr Tyr Asp Ser Lys Asn Glu Gln Met Ala Lys Leu Asn			
Gln Glu Leu Glu Gly Lys Val Ala Asp Ser Leu Ser Ser Ile Ser Ser			
Gln Ala Asp Arg Ile Tyr Leu Trp Glu Lys Phe Ser Asn Tyr Lys Thr			
Ser Ala Asn Leu Thr Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Glu Glu Met Ala Lys			
Gln Val Thr Asn Pro Ser Ser Arg Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Val Val			
Arg Thr Val Arg Asp Ser Met Glu Trp Met His Lys His Val Tyr Asn			
Ser Glu Lys Ser Ile Val Gly Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr			
Pro Arg Ala Ile Asn Asn Thr Leu Ser Leu Met Lys Glu Tyr Phe Ser			
Asp Glu Glu Ile Lys Lys Tyr Thr Asp Val Ile Glu Lys Phe Val Pro			
Asp Pro Glu His Phe Arg Lys Thr Thr Asp Asn Pro Phe Lys Ala Leu			
Gly Gly Asn Leu Val Asp Met Gly Arg Val Lys Val Ile Ala Gly Leu			
Leu Arg Lys Asp Asp Gln Glu Ile Ser Ser Thr Ile Arg Ser Ile Glu			
Gln Val Phe Lys Leu Val Asp Gln Gly Glu Gly Phe Tyr Gln Asp Gly			

Ser Tyr Ile Asp His Thr Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn
515 520 525
Val Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Leu Pro Val Ile Gln Lys Thr
530 535 540
Lys Asn Pro Ile Asp Lys Asp Lys Met Gln Thr Met Tyr His Trp Ile
545 550 555 560
Asp Lys Ser Phe Ala Pro Leu Leu Val Asn Gly Glu Leu Met Asp Met
565 570 575
Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Ala Asn Ser Glu Gly His Val Ala
580 585 590
Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Ile His Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu
595 600 605
Gly Glu Thr Lys Gln Arg Leu Gln Ser Leu Val Lys Thr Ile Val Gln
610 615 620
Ser Asp Ser Tyr Tyr Asp Val Phe Lys Asn Leu Lys Thr Tyr Lys Asp
625 630 635 640
Ile Ser Leu Met Gln Ser Leu Leu Ser Asp Ala Gly Val Ala Ser Val
645 650 655
Pro Arg Thr Ser Tyr Leu Ser Ala Phe Asn Lys Met Asp Lys Thr Ala
660 665 670
Met Tyr Asn Ala Glu Lys Gly Phe Gly Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser
675 680 685
Ser Arg Thr Leu Asn Tyr Glu His Met Asn Lys Glu Asn Lys Arg Gly
690 695 700
Trp Tyr Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Gly Asp Leu Ser
705 710 715 720
His Tyr Ser Asp Gly Tyr Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Pro
725 730 735
Gly Thr Thr Glu Thr Asp Ala Lys Arg Ala Asp Ser Asp Thr Gly Lys
740 745 750
Val Leu Pro Ser Ala Phe Val Gly Thr Ser Lys Leu Asp Asp Ala Asn
755 760 765
Ala Thr Ala Thr Met Asp Phe Thr Asn Trp Asn Gln Thr Leu Thr Ala
770 775 780
His Lys Ser Trp Phe Met Leu Lys Asp Lys Ile Ala Phe Leu Gly Ser
785 790 795 800
Asn Ile Gln Asn Thr Ser Thr Asp Thr Ala Ala Thr Thr Ile Asp Gln
805 810 815
Arg Lys Leu Glu Ser Ser Asn Pro Tyr Lys Val Tyr Val Asn Asp Lys
820 825 830
Glu Ala Ser Leu Thr Glu Gln Glu Lys Asp Tyr Pro Glu Thr Gln Ser
835 840 845
Val Phe Leu Glu Ser Ser Asp Ser Lys Lys Asn Ile Gly Tyr Phe Phe
850 855 860
Phe Lys Lys Ser Ser Ile Ser Met Ser Lys Ala Leu Gln Lys Gly Ala
865 870 875 880
Trp Lys Asp Ile Asn Glu Gly Gln Ser Asp Lys Glu Val Glu Asn Glu
885 890 895
Phe Leu Thr Ile Ser Gln Ala His Lys Gln Asn Gly Asp Ser Tyr Gly
900 905 910
Tyr Met Leu Ile Pro Asn Val Asp Arg Ala Thr Phe Asn Gln Met Ile
915 920 925
Lys Glu Leu Glu Ser Ser Leu Ile Glu Asn Asn Glu Thr Leu Gln Ser
930 935 940
Val Tyr Asp Ala Lys Gln Gly Val Trp Gly Ile Val Lys Tyr Asp Asp
945 950 955 960
Ser Val Ser Thr Ile Ser Asn Gln Phe Gln Val Leu Lys Arg Gly Val
965 970 975
Tyr Thr Ile Arg Lys Glu Gly Asp Glu Tyr Lys Ile Ala Tyr Tyr Asn
980 985 990
Pro Glu Thr Gln Glu Ser Ala Pro Asp Gln Glu Val Phe Lys Lys Leu
995 1000 1005
Glu Gln Ala Ala Gln Pro Gln Val Gln Asn Ser Lys Glu Lys Glu Lys
1010 1015 1020
Ser Glu Glu Glu Lys Asn His Ser Asp Gln Lys Asn Leu Pro Gln Thr
1025 1030 1035 1040
Gly Glu Gly Gln Ser Ile Leu Ala Ser Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly
1045 1050 1055
Ala Phe Tyr Leu Phe Arg Arg Gly Lys Asn Asn
1060 1065

<210> 240

<211> 805

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M1

<220>

5 <223> Hialuronano liasa

<400> 240

```

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

```

Ile	Val	Arg	Gly	Glu	Met	Met	Asp	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser
	370					375					380				
Arg	Phe	Asn	Ala	Gln	Ser	His	Val	Ala	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala
385					390					395					400
Ile	Leu	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu	Glu	Pro	His	Arg	Leu	Ala	Leu
			405						410					415	
Lys	Thr	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu	Val	Thr	Gln	Gly	Asn	Ala	Phe	Tyr	Asn
			420					425					430		
Val	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	His	Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys	Glu
		435					440					445			
Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Val	Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Val
	450					455					460				
Ala	Ser	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Lys	Leu	Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys	His
465					470					475					480
Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Met	Phe	Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr
				485					490					495	
Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	His	Gly	Trp	Phe	Thr	Ser	Asp	Gly
			500					505					510		
Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu	Gly	His	Tyr	Ser	Glu	Asn	Tyr
	515						520					525			
Trp	Ala	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Arg	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Glu
	530					535					540				
Gln	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Glu	Asn	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Gln
545					550					555					560
Gln	Val	Gly	Met	Thr	Gly	Leu	Ser	Asp	Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Ser	Lys
				565					570					575	
Lys	Leu	Asn	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Met	Thr	Phe	Thr	Asn	Trp
			580					585					590		
Asn	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly	Trp	Phe	Ile	Leu	Gly	Asn	Lys
		595					600					605			
Ile	Ile	Phe	Val	Gly	Ser	Asn	Ile	Lys	Asn	Gln	Ser	Ser	His	Lys	Ala
	610					615					620				
Tyr	Thr	Thr	Ile	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu	Asn	Gln	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Cys
625					630					635					640
Ser	Tyr	Val	Asn	Asn	Gln	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Asp
			645						650					655	
Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Ser	Ile	Phe	Leu	Glu	Ser	Asp	Asp	Pro	Ala	Gln
			660					665					670		
Asn	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Lys	Pro	Thr	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys
		675					680					685			
Ala	Leu	Gln	Thr	Gly	Lys	Trp	Gln	Asn	Ile	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Ser
	690					695					700				
Pro	Glu	Ala	Ile	Lys	Glu	Val	Ser	Asn	Thr	Phe	Ile	Thr	Ile	Met	Gln
705															

<210> 241
<211> 780
<212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes serotipo M2 (cepa MGAS10)

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 241

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

Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Val
465					470					475				480	
Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Val	Ala	Ser	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Lys	Leu
				485					490					495	
Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Met	Phe
			500					505					510		
Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	His
		515					520					525			
Gly	Trp	Phe	Thr	Ser	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu
	530					535						540			
Gly	His	Tyr	Ser	Glu	Asn	Tyr	Trp	Ala	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Arg	Leu
545					550					555					560
Pro	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Glu	Gln	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Glu
				565						570					575
Asn	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Gln	Gln	Val	Gly	Met	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp
			580					585					590		
Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Ser	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala
		595					600					605			
Ala	Met	Thr	Phe	Thr	Asn	Trp	Asn	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly
	610					615						620			
Trp	Phe	Ile	Leu	Gly	Asn	Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	Ser	Asn	Ile	Lys
625					630					635					640
Asn	Gln	Ser	Ser	His	Lys	Ala	Tyr	Thr	Thr	Ile	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu
				645						650				655	
Asn	Gln	Lys	His	Pro	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Val	Asn	Asn	Gln	Pro	Val	Asp
			660					665					670		
Leu	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Asp	Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Ser	Ile	Phe	Leu
		675					680						685		
Glu	Ser	Asp	Asp	Pro	Ala	Gln	Asn	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Lys	Pro
	690					695						700			
Arg	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Leu	Gln	Thr	Gly	Lys	Trp	Gln	Asn
705					710					715					720
Ile	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Ser	Pro	Glu	Ala	Ile	Lys	Glu	Val	Ser	Asn
				725					730					735	
Thr	Phe	Ile	Thr	Ile	Met	Gln	Asn	His	Thr	Gln	Glu	Gly	Asp	Arg	Tyr
			740					745					750		
Ala	Tyr	Met	Met	Leu	Pro	Asn	Met	Thr	Arg	Gln	Glu	Phe	Glu	Thr	Tyr
		755					760					765			
Ile	Ser	Lys	Leu	Asp	Ile	Asp	Leu	Leu	Glu	Asn	Asn				
	770					775					780				

<210> 242
 <211> 868
 5 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes serotipo M4 (cepa MGAS10)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

10 <400> 242

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

Phe	His	Asn	Lys	Ala	Glu	Lys	Asp	Ala	Gln	Asn	Ile	Ile	Lys	Ser	Tyr
		100						105					110		
Gln	Glu	Pro	Asp	His	Glu	Asn	Arg	Thr	Tyr	Leu	Trp	Glu	His	Ala	Lys
		115						120					125		
Asp	Tyr	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr	Lys	Thr	Tyr	Arg	Asn	Ile	Glu
		130						135				140			
Lys	Ile	Ala	Lys	Gln	Ile	Thr	Asn	Pro	Glu	Ser	Cys	Tyr	Tyr	Gln	Asp
145						150				155					160
Ser	Lys	Ala	Ile	Ala	Ile	Val	Lys	Asp	Gly	Met	Ala	Phe	Met	Tyr	Glu
						165				170				175	
His	Ala	Tyr	Asn	Leu	Asp	Arg	Glu	Asn	His	Gln	Thr	Thr	Gly	Lys	Glu
			180					185					190		
Asn	Lys	Glu	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala	Ile
		195						200					205		
Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu	Met	Tyr	Pro	Tyr	Phe	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile
		210				215						220			
Leu	Lys	Tyr	Thr	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Arg
225					230					235					240
Phe	Arg	Val	Arg	Ala	Ala	Asn	Phe	Pro	Pro	Phe	Glu	Ala	Asn	Ser	Gly
					245					250				255	
Asn	Leu	Ile	Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys	Leu	Ile	Ser	Gly	Ile	Leu	Arg
			260					265					270		
Lys	Asp	Asp	Leu	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Lys	Val
		275						280					285		
Phe	Thr	Leu	Val	Asp	Glu	Gly	Asn	Gly	Phe	Tyr	Gln	Asp	Gly	Ser	Leu
		290				295						300			
Ile	Asp	His	Val	Val	Thr	Asn	Ala	Gln	Ser	Pro	Leu	Tyr	Lys	Lys	Gly
305						310				315					320
Ile	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Ser
					325					330				335	
Gln	Leu	Ile	Pro	Ile	Ile	Gln	Lys	Thr	Lys	Ser	Pro	Ile	Glu	Ala	Asp
			340					345					350		
Lys	Met	Ala	Thr	Ile	Tyr	His	Trp	Ile	Asn	His	Ser	Phe	Phe	Pro	Ile
		355					360						365		
Ile	Val	Arg	Gly	Glu	Met	Met	Asp	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser
		370				375						380			
Arg	Phe	Asn	Ala	Gln	Ser	His	Val	Ala	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala
385					390					395					400
Ile	Leu	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu	Glu	Pro	His	Arg	Leu	Ala	Leu
				405						410				415	
Lys	Thr	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu	Val	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Tyr	Asn
			420					425					430		
Val	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	His	Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys	Glu
		435						440					445		
Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Val	Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Val
		450				455						460			
Ala	Ser	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Lys	Leu	Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys	His
465					470					475					480
Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Met	Phe	Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr
				485						490				495	
Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	His	Gly	Trp	Phe	Thr	Ser	Asp	Gly
			500					505					510		
Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu	Gly	His	Tyr	Ser	Glu	Asn	Tyr
		515					520						525		
Trp	Ala	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Arg	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Glu
		530				535						540			
Gln	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Glu	Asn	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Gln
545					550					555					560
Gln	Val	Gly	Met	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Ser	Lys
				565					570					575	
Lys	Leu	Asn	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Met	Thr	Phe	Thr	Asn	Trp
			580					585					590		
Asn	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly	Trp	Phe	Ile	Leu	Gly	Asn	Lys

```

      595      600      605
Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys Asn Gln Ser Ser His Lys Ala
 610      615      620
Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu Asn Gln Lys His Pro Tyr Cys
625      630      635      640
Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp
      645      650      655
Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu Glu Ser Asp Asp Pro Ala Gln
      660      665      670
Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro Thr Thr Leu Ser Ile Ser Lys
      675      680      685
Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser
690      695      700
Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln
705      710      715      720
Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn
      725      730      735
Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp
      740      745      750
Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala Ala Val Tyr Asp His Asp Ser
      755      760      765
Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Thr Phe Ser
770      775      780
Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe Tyr Ser Phe Pro His Pro Val
785      790      795      800
Lys Gln Asn Gln Gln Gln Lys Leu Ala His Gln Gly Ile Ala Ala Lys
      805      810      815
Asn Asn Ala Leu Asn Ser His Lys Ile Pro His Lys Arg Gln Arg Arg
      820      825      830
Leu Pro Arg Thr Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Leu Glu Phe Leu Gly Gly
      835      840      845
Ala Leu Val Ala Ser Phe Asn His Ile Thr Lys Pro Phe Arg Lys Lys
850      855      860
Asp Leu Arg Ile
865

```

<210> 243

<211> 828

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M6

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 243

```

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

```

130		135		140	
Tyr	Leu	Trp	Glu	His	Ala
145					150
Lys	Thr	Tyr	Arg	Asn	Ile
					165
Glu	Ser	Cys	Tyr	Tyr	Gln
					180
Gly	Met	Ala	Phe	Met	Tyr
					195
His	Gln	Thr	Thr	Gly	Lys
					210
Ile	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala
225					230
Tyr	Phe	Thr	Gln	Glu	Glu
					245
Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr
					260
Pro	Phe	Glu	Ala	Asn	Ser
					275
Leu	Ile	Ser	Gly	Ile	Leu
					290
Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Lys
305					310
Phe	Tyr	Gln	Asp	Gly	Ser
					325
Ser	Pro	Leu	Tyr	Lys	Lys
					340
Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu
					355
Lys	Ser	Pro	Ile	Glu	Ala
					370
Asn	His	Ser	Phe	Phe	Pro
385					390
Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile
					405
Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Arg
					420
Glu	Pro	His	Arg	Leu	Ala
					435
Gln	Gly	Asn	Ala	Phe	Tyr
					450
Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys
465					470
Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr
					485
Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys
					500
Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn
					515
Gly	Trp	Phe	Thr	Ser	Asp
					530
Gly	His	Tyr	Ser	Glu	Asn
545					550
Pro	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr
					565
Asn	Ile	Lys	Thr	Asp	Tyr
					580
Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Ser
					595
Ala	Met	Thr	Phe	Thr	Asn
					610
Trp	Phe	Ile	Leu	Gly	Asn
625					630

ES 2 727 137 T3

Asn	Gln	Ser	Ser	His	Lys	Ala	Tyr	Thr	Thr	Ile	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu
				645					650					655	
Asn	Gln	Lys	His	Pro	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Val	Asn	Asn	Gln	Pro	Val	Asp
			660					665					670		
Leu	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Asp	Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Ser	Ile	Phe	Leu
		675					680					685			
Glu	Ser	Asp	Asp	Pro	Ala	Gln	Asn	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Lys	Pro
	690					695					700				
Thr	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Leu	Gln	Thr	Gly	Lys	Trp	Gln	Asn
705					710					715				720	
Ile	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Ser	Pro	Glu	Ala	Ile	Lys	Glu	Val	Ser	Asn
			725						730					735	
Thr	Phe	Ile	Thr	Ile	Met	Gln	Asn	His	Thr	Gln	Asp	Gly	Asp	Arg	Tyr
			740					745					750		
Ala	Tyr	Met	Met	Leu	Pro	Asn	Met	Thr	Arg	Gln	Glu	Phe	Glu	Thr	Tyr
		755					760					765			
Ile	Ser	Lys	Leu	Asp	Ile	Asp	Leu	Leu	Glu	Asn	Asn	Asp	Lys	Leu	Ala
	770					775					780				
Ala	Val	Tyr	Asp	His	Asp	Ser	Gln	Gln	Met	His	Val	Ile	His	Tyr	Glu
785					790					795					800
Lys	Lys	Ala	Thr	Met	Phe	Ser	Asn	His	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Phe
				805					810					815	
Tyr	Ser	Phe	Pro	His	Pro	Val	Lys	Gln	Asn	Gln	Gln				
			820					825							

<210> 244

<211> 556

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M12 (cepa MGAS2)

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 244

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


```

Ile Asn Gly Glu Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser
225                230                235                240
Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp Val Lys His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala
                245                250                255
Thr Ala Asp Met Lys Arg Leu Ala Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu
                260                265                270
Glu Pro Lys Ser Thr Asp Val Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly
                275                280                285
Gly Thr Lys Phe Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu
                290                295                300
Asn Gln Asp Lys Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn
305                310                315                320
Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser
                325                330                335
Lys Asn Pro Val Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Asp Tyr Lys
                340                345                350
Leu Tyr Lys Asp Asp Thr Gln Thr Thr Asn Ser Asp Asn Gln Glu Thr
                355                360                365
Asn Ser Leu Phe Leu Glu Ser Thr Asn Ser Thr Gln Asn Asn Ile Gly
370                375                380
Tyr His Phe Leu Asn Glu Ser Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His
385                390                395                400
Thr Gly Lys Trp Ser Asp Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Ile Gln Lys
                405                410                415
Thr Asp Glu Tyr Tyr Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Thr Asp Ser
                420                425                430
Lys Tyr Ala Tyr Val Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Val Phe Lys
                435                440                445
Ser Lys Ala Ser Lys Val Thr Val Lys Gln Glu Asp Asp Phe His
450                455                460
Val Val Lys Asp Asn Glu Ser Val Trp Ala Gly Ile Asn Tyr Ser Asp
465                470                475                480
Ser Ala Lys Thr Phe Glu Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala
                485                490                495
Lys Gly Met Phe Ile Leu Thr Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys
500                505                510
Ser Phe Tyr Asn Pro Glu Ser Thr Asn Ser Val Ser Asp Ile Glu Ser
515                520                525
Lys Ile Ser Met Thr Gly Tyr Ser Ile Ile Asn Lys Asn Thr Ser Thr
530                535                540
Ser Asn Glu Ser Gly Val Arg Phe Glu Leu Thr Lys
545                550                555

```

<210> 245
 <211> 635
 5 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes serotipo M12 (cepa MGAS2)

<220>
 <223> Hialuronano liasa

10 <400> 245

```

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

```

Phe Glu Ala Ser Ser Gly Asn Leu Ile Asp Met Gly Arg Val Lys Leu
 85 90 95
 Ile Ser Gly Ile Leu Arg Lys Asp Asp Leu Glu Ile Ser Asp Thr Ile
 100 105 110
 Lys Ala Ile Glu Lys Val Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly Phe
 115 120 125
 Tyr Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp His Val Val Thr Asn Ala Gln Ser
 130 135 140
 Pro Leu Tyr Lys Lys Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val
 145 150 155 160
 Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr Lys
 165 170 175
 Ser Pro Ile Glu Ala Asp Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile Asn
 180 185 190
 His Ser Phe Phe Pro Ile Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met Thr
 195 200 205
 Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala Gly
 210 215 220
 Ile Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu Glu
 225 230 235 240
 Pro His Arg Leu Ala Leu Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr Gln
 245 250 255
 Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His Asp
 260 265 270
 Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val Gln
 275 280 285
 Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu Ala
 290 295 300
 Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe Ser
 305 310 315 320
 Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His Gly
 325 330 335
 Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu Gly
 340 345 350
 His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu Pro
 355 360 365
 Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu Asn
 370 375 380
 Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp Asp
 385 390 395 400
 Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala Ala
 405 410 415
 Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly Trp
 420 425 430
 Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys Asn
 435 440 445
 Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu Asn
 450 455 460
 Gln Lys His Pro Tyr Cys Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp Leu
 465 470 475 480
 Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu Glu
 485 490 495
 Ser Asp Asp Pro Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro Thr
 500 505 510
 Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn Ile
 515 520 525
 Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn Thr
 530 535 540
 Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr Ala
 545 550 555 560
 Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr Ile
 565 570 575
 Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala Ala
 580 585 590
 Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu Lys
 595 600 605
 Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe Tyr
 610 615 620
 Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln
 625 630 635

<210> 246

<211> 828

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M12 (cepa MGAS9)

<220>

5 <223> Hialuronano liasa

<400> 246

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

Lys	Ser	Pro	Ile	Glu	Ala	Asp	Lys	Met	Ala	Thr	Ile	Tyr	His	Trp	Ile	
	370					375					380					
Asn	His	Ser	Phe	Phe	Pro	Ile	Ile	Val	Arg	Gly	Glu	Met	Met	Asp	Met	
385					390					395					400	
Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Arg	Phe	Asn	Ala	Gln	Ser	His	Val	Ala	
				405					410					415		
Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Ile	Leu	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu	
			420					425					430			
Glu	Pro	His	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu	Val	Thr	
		435					440					445				
Gln	Gly	Asn	Ala	Phe	Tyr	Asn	Val	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	His	
	450					455					460					
Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Val	
465					470					475					480	
Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Val	Ala	Ser	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Lys	Leu	
				485					490					495		
Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Met	Phe	
			500					505					510			
Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	His	
		515					520					525				
Gly	Trp	Phe	Thr	Ser	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu	
	530					535					540					
Gly	His	Tyr	Ser	Glu	Asn	Tyr	Trp	Ala	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Arg	Leu	
545					550					555					560	
Pro	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Glu	Gln	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Glu	
				565						570				575		
Asn	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Gln	Gln	Val	Gly	Met	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	
			580					585					590			
Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Ser	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala	
		595					600					605				
Ala	Met	Thr	Phe	Thr	Asn	Trp	Asn	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly	
	610					615					620					
Trp	Phe	Ile	Leu	Gly	Asn	Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	Ser	Asn	Ile	Lys	
625					630					635					640	
Asn	Gln	Ser	Ser	His	Lys	Ala	Tyr	Thr	Thr	Ile	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu	
				645						650				655		
Asn	Gln	Lys	His	Pro	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Val	Asn	Asn	Gln	Pro	Val	Asp	
			660					665					670			
Leu	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Asp	Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Ser	Ile	Phe	Leu	
		675					680					685				
Glu	Ser	Asp	Asp	Pro	Ala	Gln	Asn	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Lys	Pro	
	690					695										

<210> 247
<211> 828
<212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes serotipo M28

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 247

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

Gln	Gly	Asn	Ala	Phe	Tyr	Asn	Val	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	His
	450					455					460				
Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Val
465					470					475					480
Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Val	Ala	Ser	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Lys	Leu
				485					490					495	
Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Met	Phe
			500					505					510		
Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Leu	His
		515					520					525			
Gly	Trp	Phe	Thr	Ser	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu
	530					535						540			
Gly	His	Tyr	Ser	Glu	Asn	Tyr	Trp	Ala	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Arg	Leu
545					550					555					560
Pro	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Glu	Gln	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Glu
				565					570					575	
Asn	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Gln	Gln	Val	Gly	Met	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp
			580					585					590		
Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Ser	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala
		595					600					605			
Ala	Met	Thr	Phe	Thr	Asn	Trp	Asn	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly
	610				615						620				
Trp	Phe	Ile	Leu	Gly	Asn	Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	Ser	Asn	Ile	Lys
625					630					635					640
Asn	Gln	Ser	Ser	His	Lys	Ala	Tyr	Thr	Thr	Ile	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu
				645					650					655	
Asn	Gln	Lys	His	Pro	Tyr	His	Ala	Tyr	Val	Asn	Asn	Gln	Pro	Val	Asp
			660					665					670		
Leu	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Asp	Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Ser	Ile	Phe	Leu
		675				680						685			
Glu	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Gln	Asn	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Lys	Pro
	690				695						700				
Thr	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Leu	Gln	Thr	Gly	Lys	Trp	Gln	Asn
705					710					715					720
Ile	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Ser	Pro	Glu	Ala	Ile	Lys	Glu	Val	Ser	Asn
			725					730						735	
Thr	Phe	Ile	Thr	Ile	Met	Gln	Asn	His	Thr	Gln	Asp	Gly	Asp	Arg	Tyr
			740					745					750		
Ala	Tyr	Met	Met	Leu	Pro	Asn	Met	Thr	Arg	Gln	Glu	Phe	Glu	Thr	Tyr
		755				760						765			
Ile	Ser	Lys	Leu	Asp	Ile	Asp	Leu	Leu	Glu	Asn	Asn	Asp	Lys	Leu	Ala
	770				775						780				
Ala	Val	Tyr	Asp	His	Asp	Ser	Gln	Gln	Met	His	Val	Ile	His	Tyr	Glu
785					790					795					800
Lys	Lys	Ala	Thr	Met	Phe	Ser	Asn	His	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Phe
			805					810						815	
Tyr	Ser	Phe	Pro	His	Pro	Val	Lys	Gln	Asn	Gln	Gln				
			820					825							

<210> 248

<211> 522

5 <212> PRT

<213> Streptococcus suis

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 248

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

Thr	Arg	Val	Ala	Ala	Asn	Gln	Leu	Pro	Ser	Thr	Glu	Thr	Ala	Ser	Pro
		35					40					45			
Gln	Ser	Ser	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Thr	Pro	Glu	Thr	Thr	Glu	Ala	Val
		50				55					60				
Asn	Leu	Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Met	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Ser	Glu	Val
65				70						75					80
Ser	Pro	Val	Thr	Ser	Thr	Glu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Thr	Ala	Ala	Glu
			85						90					95	
Thr	Leu	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Val	Gln	Ala	Thr	Lys	Glu	Glu	Glu	Lys
			100					105					110		
Asn	Leu	Val	Ala	Asn	Gly	Glu	Phe	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Gly
		115				120						125			
Asn	Trp	Ala	Asp	Pro	Ala	Ala	Thr	Asn	Trp	Glu	Thr	Trp	Ile	Pro	Ala
130					135						140				
Asn	Val	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly	Gln	Val	Arg	Ile	Asp	Glu	Gly	Arg	Leu
145				150						155					160
His	Ile	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	Tyr	Arg	Val	Ala	Val	His	Gln	Thr	Val
			165					170						175	
Asp	Val	Asp	Pro	Asn	Lys	Arg	Tyr	Leu	Phe	Ser	Tyr	Asn	Val	Glu	Thr
			180					185					190		
Lys	Asp	Leu	Lys	Gly	Ser	Gly	Val	Arg	Val	Arg	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr
		195				200						205			
Ala	Glu	Gly	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Phe	Ala	Tyr	Thr	Pro	Tyr
		210				215					220				
Lys	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Glu	His	Ile	Glu	Gln	Ile	Leu	Thr	Val	Ser
225				230						235					240
Pro	Glu	Thr	Arg	Lys	Leu	Lys	Val	Glu	Leu	Phe	Phe	Glu	Asn	Ser	Val
			245						250					255	
Gly	Gln	Ala	Trp	Leu	Asp	Asn	Ile	Ser	Leu	Val	Glu	Tyr	Val	Glu	Lys
		260						265					270		
Thr	Pro	Glu	Thr	Pro	Glu	Pro	Ser	Leu	Glu	Leu	Val	Gln	Pro	Glu	Thr
		275					280					285			
Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	Ala	Ser	Asn	Lys	Val	Tyr	Leu	Pro	Val	Arg	Pro
		290				295					300				
Asp	Leu	Thr	Tyr	Arg	Ile	Ala	Asp	Ala	Ala	Val	Ala	Ile	Val	Glu	Lys
305				310						315					320
Asn	Met	Ile	Arg	Pro	Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Thr	Gln	Val	Asp	Val	Tyr
			325						330					335	
Asp	Lys	Asp	Thr	Lys	Leu	Ser	Ser	Phe	Glu	Leu	Thr	Val	Thr	Glu	His
			340					345					350		
Gln	Ala	Thr	Val	Phe	Asp	Thr	Leu	Arg	Asn	Asn	Trp	Glu	Asp	Ile	Ser
		355				360						365			
Leu	Ala	Asn	Lys	Arg	Tyr	Gln	Ser	Asn	Asp	Thr	Gln	Met	Lys	Ala	Phe
		370				375					380				
Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Ala	Gly	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Lys	Lys	Trp	Val
385				390						395					400
Glu	Pro	Thr	Asn	Gln	Gly	Lys	Thr	Ile	Phe	Asn	Asp	Ile	Asp	Phe	Ser
			405						410					415	
Lys	Ser	Ser	His	Leu	Thr	Thr	Val	Tyr	Arg	Arg	Leu	Glu	Gln	Met	Ala
			420					425					430		
Gln	Val	Val	Glu	Asn	Pro	Asp	Ser	Ala	Tyr	Tyr	His	Asp	Arg	Ser	Leu
		435				440						445			
Ile	Asp	Leu	Val	Arg	Lys	Gly	Met	Asn	Trp	Leu	Tyr	Thr	Asn	Val	Tyr
		450				455					460				
Asn	Glu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asp	Gly	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly
465				470						475					480
Thr	Pro	Arg	Ala	Val	Val	Asn	Thr	Leu	Ile	Tyr	Met	His	Pro	Tyr	Phe
			485					490						495	
Ser	Gln	Glu	Glu	Ile	Leu	Thr	Tyr	Thr	Lys	Pro	Ile	Ser	Lys	Phe	Val
			500					505					510		
Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Ile	Ser	Val	Lys	His						
			515				520								

<210> 249
 <211> 1164
 5 <212> PRT
 <213> Streptococcus suis

<220>
 <223> Hialuronano liasa

<400> 249

```

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

```


			420					425					430			
Ala	Tyr	Tyr	His	Asp	Arg	Ser	Leu	Ile	Asp	Leu	Val	Arg	Lys	Gly	Met	
		435					440					445				
Asn	Trp	Leu	Tyr	Ala	Asn	Val	Tyr	Asn	Glu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asp	Gly	
	450					455					460					
Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Asn	Thr	
465					470					475					480	
Leu	Ile	Tyr	Met	His	Pro	Tyr	Phe	Ser	Gln	Glu	Glu	Ile	Leu	Thr	Tyr	
				485					490					495		
Thr	Lys	Pro	Ile	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Ile	Arg	Lys	
			500					505					510			
Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Ala	Val	Gly	Gly	Asn	Gln	Thr	Asp	Leu	
		515					520					525				
Ser	Lys	Val	Ala	Ile	Leu	Glu	Gly	Ala	Leu	Arg	Glu	Asp	Ala	Asp	Arg	
	530					535					540					
Val	Arg	Ala	Gly	Ala	Gln	Gly	Leu	Thr	Thr	Ile	Met	Lys	Phe	Val	Asp	
545					550					555					560	
Lys	Gly	Glu	Gly	Phe	Tyr	Arg	Asp	Gly	Ser	Phe	Ile	Asp	His	Thr	Asn	
				565					570					575		
Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Glu	Gly	Phe	Ser	
			580					585					590			
Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Gln	Pro	Thr	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys	Glu	Glu	
		595					600					605				
Gln	Thr	Asn	Ile	Leu	Tyr	Glu	Trp	Ile	Glu	Lys	Ala	Phe	Met	Pro	Ile	
	610					615					620					
Leu	Val	Arg	Gly	Glu	Leu	Met	Asp	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	
625					630					635					640	
Arg	Ala	Thr	Gly	Glu	Ser	His	Val	Gln	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	Arg	Ser	
				645					650					655		
Leu	Val	Arg	Ile	Ala	Glu	Ser	Ala	Gln	Pro	Glu	Gln	Lys	Thr	Lys	Leu	
			660					665					670			
Leu	Ser	Phe	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Thr	Ser	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asp	Ser	
		675					680					685				
Tyr	Arg	Ser	Leu	Lys	Ser	Tyr	Lys	Asp	Ile	Asp	Leu	Val	Asn	Lys	Leu	
	690					695					700					
Leu	Ala	Asp	Asn	Gln	Ile	Pro	Ala	Glu	Val	Asp	Lys	Asp	Tyr	Ile	Ala	
705					710					715					720	
Ala	Phe	Asn	Asn	Met	Asp	Lys	Phe	Val	Tyr	Arg	Ser	Ala	Gln	Glu	Gly	
				725					730					735		
Phe	Thr	Phe	Ala	Leu	Ser	Met	Tyr	Ser	Ser	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr	Glu	
			740					745					750			
Asp	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Arg	Lys	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ala	Asp	Gly	Met	
		755					760					765				
Val	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	His	Tyr	Ser	Asn	His	Tyr	Trp	
	770				775	</										

ES 2 727 137 T3

Lys	Leu	Asp	Gln	Arg	Thr	Gly	Lys	Trp	Ser	Asp	Ile	Asn	Tyr	Asn	Gln
930						935					940				
Ser	Lys	Glu	Glu	Val	Ser	Asn	Ser	Phe	Val	Ser	Leu	Trp	His	Glu	His
945					950					955					960
Ala	Gln	Thr	Ser	Ser	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Val	Leu	Val	Pro	Asn	Gln	Ser
				965					970					975	
Met	Glu	Lys	Val	Asn	Gln	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Leu	His	Gln
			980					985					990		
Asp	Arg	Asp	Leu	Gln	Val	Val	Tyr	Asp	Gln	Glu	Gln	Asn	Val	Trp	Gly
		995					1000					1005			
Val	Val	Lys	Tyr	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr	Lys	Leu	Thr	Asp	Asp	Ile	Thr
	1010					1015					1020				
Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Thr	Ile	Gln	Lys	Val	Glu	Gly	Gly	Tyr
1025					1030					1035					1040
Arg	Ile	Ala	Phe	Tyr	Asn	Pro	Ser	Thr	Arg	Thr	Val	Lys	Asn	Gly	Ile
				1045					1050					1055	
Glu	Leu	Thr	Lys	Ala	Gly	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Glu	Met	Glu	Pro	Thr
			1060					1065					1070		
Ala	Ala	Tyr	Pro	Ser	Thr	Val	Trp	Lys	Val	Thr	Met	Pro	Glu	Gly	Ser
		1075					1080					1085			
Asp	Lys	Gln	Thr	Gly	Ser	Val	Glu	Lys	Thr	Glu	Lys	Glu	Glu	Lys	Gln
	1090					1095					1100				
Leu	Lys	Glu	Asn	Gln	Pro	Ser	Ser	Glu	Val	Lys	Gln	Val	Val	His	His
1105					1110					1115					1120
Ala	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	Thr	Gly
				1125					1130					1135	
Glu	Glu	Ala	Ser	Leu	Gly	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Thr	Leu	Gly
			1140					1145					1150		
Ala	Val	Val	Asp	Phe	Lys	Cys	Arg	Arg	Ser	His	Ser				
		1155					1160								

<210> 250

<211> 1164

5 <212> PRT

<213> Streptococcus suis

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 250

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

Leu	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Lys	Gly	Ser	Gly	Val
			180					185					190		
Arg	Val	Arg	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	Gly	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro
			195				200					205			
Gln	Glu	Phe	Ala	Tyr	Thr	Pro	Tyr	Lys	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Glu	His
			210			215				220					
Ile	Glu	Gln	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Glu	Thr	Arg	Lys	Leu	Lys	Val
225					230					235				240	
Glu	Leu	Phe	Phe	Glu	Asn	Ser	Val	Gly	Gln	Ala	Trp	Leu	Asp	Asn	Ile
			245					250					255		
Ser	Leu	Val	Glu	Tyr	Val	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Thr	Pro	Glu	Gln	Ser
			260					265					270		
Pro	Glu	Leu	Val	Gln	Pro	Glu	Thr	Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	Ala	Ser	Asn
			275				280					285			
Lys	Val	Tyr	Leu	Pro	Val	Arg	Pro	Asp	Leu	Thr	Tyr	Arg	Ile	Ala	Asp
			290			295					300				
Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Val	Glu	Lys	Asn	Met	Ile	Arg	Pro	Leu	Ala	Ala
305					310					315				320	
Gly	Lys	Thr	Gln	Val	Asp	Val	Tyr	Asp	Lys	Asp	Thr	Lys	Leu	Ser	Ser
			325					330					335		
Phe	Glu	Leu	Ile	Val	Thr	Glu	His	Gln	Ala	Thr	Val	Phe	Asp	Thr	Leu
			340					345					350		
Arg	Asn	Asn	Trp	Glu	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala	Asn	Lys	Arg	Tyr	Gln	Ser
			355				360					365			
Asn	Asp	Ala	Gln	Met	Lys	Ala	Phe	Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Ala	Gly	Val
			370			375					380				
Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Trp	Val	Glu	Pro	Thr	Glu	Gln	Ser	Lys	Thr
385					390					395				400	
Ile	Phe	Asn	Asp	Ile	Asp	Phe	Ser	Lys	Ser	Ser	His	Leu	Thr	Thr	Val
			405					410					415		
Tyr	Arg	Arg	Leu	Glu	Gln	Met	Ala	Gln	Val	Val	Glu	Asn	Pro	Asp	Ser
			420					425					430		
Ala	Tyr	Tyr	His	Asp	Arg	Ser	Leu	Ile	Asp	Leu	Val	Arg	Lys	Gly	Met
			435				440					445			
Asn	Trp	Leu	Tyr	Thr	Asn	Val	Tyr	Asn	Glu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asp	Gly
			450			455					460				
Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala	Val	Val	Asn	Thr
465					470					475				480	
Leu	Ile	Tyr	Met	His	Pro	Tyr	Phe	Ser	Gln	Glu	Glu	Ile	Leu	Thr	Tyr
			485					490					495		
Thr	Lys	Pro	Ile	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Ile	Arg	Lys
			500					505					510		
Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Ala	Val	Gly	Gly	Asn	Gln	Thr	Asp	Leu
			515				520					525			
Ser	Lys	Val	Ala	Ile	Leu	Glu	Gly	Ala	Leu	Arg	Glu	Asp	Ala	Asp	Arg
			530			535					540				
Val	Arg	Ala	Gly	Ala	Gln	Gly	Leu	Thr	Thr	Ile	Met	Lys	Phe	Val	Asp
545					550					555				560	
Lys	Gly	Glu	Gly	Phe	Tyr	Arg	Asp	Gly	Ser	Phe	Ile	Asp	His	Thr	Asn
			565					570					575		
Val	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Glu	Gly	Phe	Ser
			580					585					590		
Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Gln	Pro	Thr	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys	Glu	Glu
			595				600					605			
Gln	Thr	Asn	Ile	Leu	Tyr	Glu	Trp	Ile	Glu	Lys	Ala	Phe	Met	Pro	Ile
			610			615					620				
Leu	Val	Arg	Gly	Glu	Leu	Met	Asp	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser
625					630					635				640	
Arg	Ala	Thr	Gly	Glu	Ser	His	Val	Gln	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	Arg	Ser
			645					650					655		
Leu	Val	Arg	Ile	Ala	Glu	Ser	Ala	Gln	Pro	Glu	Gln	Lys	Thr	Lys	Leu
			660					665				670			
Leu	Ser	Phe	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Thr	Ser	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asp	Ser

			675					680					685				
Tyr	Arg	Ser	Leu	Lys	Ser	Tyr	Lys	Asp	Ile	Asp	Leu	Val	Asn	Lys	Leu		
	690					695				700							
Leu	Ala	Asp	Asn	Gln	Ile	Pro	Ala	Glu	Val	Asp	Lys	Asp	Tyr	Ile	Ala		
705					710					715					720		
Ala	Phe	Asn	Asn	Met	Asp	Lys	Phe	Val	Tyr	Arg	Ser	Ala	Gln	Glu	Gly		
				725					730					735			
Phe	Thr	Phe	Ala	Leu	Ser	Met	Tyr	Ser	Ser	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr	Glu		
			740					745					750				
Asp	Met	Asn	Asn	Glu	Asn	Arg	Lys	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ala	Asp	Gly	Met		
		755					760					765					
Val	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	His	Tyr	Ser	Asn	His	Tyr	Trp		
	770				775					780							
Ala	Thr	Val	Asp	Pro	Tyr	Arg	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Asp		
785					790					795					800		
Lys	Arg	Glu	Asp	Gly	Ser	Gly	Glu	Val	Thr	Leu	Ala	Ser	Asp	Phe	Val		
			805						810					815			
Gly	Ala	Ser	Gln	Leu	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Thr	Ile	Ala	Met	Asp	Phe		
			820					825					830				
Asn	Asn	Trp	Asn	Asn	Ser	Leu	Thr	Ala	Arg	Lys	Ala	Trp	Ile	Val	Leu		
		835					840					845					
Gly	Asn	Lys	Ile	Val	Phe	Leu	Gly	Thr	Asp	Ile	Gln	His	Gln	Ser	Ala		
	850					855					860						
Gln	Gly	Ala	Glu	Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Leu	Leu	Thr	Gly	Glu		
865					870					875					880		
Lys	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Asn	Gly	Gln	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Glu		
			885						890					895			
Val	Val	Thr	Asp	Lys	Thr	Gln	Ser	Phe	Tyr	Met	Thr	Asn	Gly	Lys	Asp		
			900					905					910				
Asn	Gln	Ser	Ile	Gly	Tyr	Val	Phe	Leu	Asn	Gln	Leu	Pro	Thr	His	Ala		
		915					920					925					
Lys	Leu	Asp	Gln	Arg	Thr	Gly	Lys	Trp	Ser	Asp	Ile	Asn	Tyr	Asn	Gln		
	930					935					940						
Ser	Lys	Glu	Glu	Val	Ser	Asn	Ser	Phe	Val	Ser	Leu	Trp	His	Glu	His		
945					950					955					960		
Ala	Gln	Thr	Ser	Ser	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Val	Leu	Val	Pro	Asn	Gln	Ser		
				965					970					975			
Met	Glu	Lys	Val	Asn	Gln	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Leu	His	Gln		
			980					985					990				
Asp	Arg	Asp	Leu	Gln	Val	Val	Tyr	Asp	Gln	Glu	Gln	Asn	Val	Trp	Gly		
		995					1000					1005					
Val	Val	Lys	Tyr	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr	Lys	Leu	Thr	Asp	Asp	Ile	Thr		
	1010					1015						1020					
Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Thr	Ile	Gln	Lys	Val	Glu	Gly	Gly	Tyr		
1025																	

<210> 251
<211> 802
<212> PRT
<213> *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601/ES114)

<220>
<223> Hialuronano liasa

<400> 251

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

Val	His	Arg	Arg	Thr	Asp	Trp	Ala	Phe	Ala	Leu	Ala	Met	His	Ser	Tyr		
		435					440					445					
Arg	Ile	Gly	Asn	Tyr	Glu	Cys	Met	Asn	Gly	Glu	Asn	Leu	Lys	Gly	Trp		
	450					455					460						
Phe	Thr	Gly	Asp	Gly	Met	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Gln	Leu	Asp	His		
465					470						475				480		
Tyr	Thr	Gly	Tyr	Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Ala	Ser	Arg	Met	Pro	Gly	Thr		
				485					490					495			
Thr	Val	Asp	Ser	Gln	Ile	Met	Ala	Asp	Cys	Ser	Gly	Glu	Arg	Val	Gly		
			500					505				510					
Gly	Asn	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gln	Trp	Val	Gly	Ser	Thr	Ser	Leu	Asn		
	515						520					525					
Asn	Tyr	Gly	Ile	Ala	Gly	Met	Gln	Phe	Tyr	Asn	Trp	Ser	Asp	Thr	Leu		
	530					535					540						
Ser	Ala	Tyr	Lys	Ser	Trp	Phe	Met	Phe	Asp	Asn	Glu	Val	Val	Met	Leu		
545					550				555						560		
Gly	Ser	Asn	Ile	Lys	Asp	Gln	Ser	Asn	Ala	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Ile		
				565					570					575			
Glu	Asn	Arg	Lys	Arg	Leu	Ala	Glu	Thr	Lys	Leu	Phe	Ile	Asp	Gly	Thr		
			580					585					590				
Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Pro	Tyr	Gln	Gly	Ala	Pro	Ala	Thr	Phe	Ser	Ile		
	595						600					605					
Arg	Asn	Lys	Thr	Leu	Ala	Asn	Ser	Asp	Leu	Ser	Tyr	Val	Met	Leu	Thr		
	610					615					620						
Pro	Lys	Thr	Ile	Ser	Ile	Ser	Gln	Asn	Asp	Val	Asp	Gly	Asn	Trp	Ser		
625					630				635					640			
Asp	Ile	Gly	Asn	Ser	Lys	Gly	Asp	Val	Ser	Asp	Ser	Tyr	Leu	Gln	Ala		
				645					650					655			
Thr	Leu	Thr	Gln	Val	Asp	Gln	Ala	Asp	Tyr	Gln	Tyr	Ala	Leu	Leu	Pro		
			660					665					670				
Asn	Gln	Asn	Asn	Asp	Thr	Val	Gln	Asn	Tyr	Ala	Gln	His	Pro	Asp	Val		
	675						680					685					
Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Asp	Glu	Gln	Ala	His	Ala	Val	Gln	Glu	Asn	Thr		
	690					695					700						
Leu	Asn	Ile	Ile	Ala	Ala	Asn	Asn	Trp	Lys	Asn	Asn	Pro	Val	Asn	Ile		
705					710				715					720			
Thr	Asp	Thr	Ile	Thr	Leu	Asn	Ser	Met	Met	Gly	Phe	Met	Ile	Lys	Glu		
				725					730					735			
Glu	Ser	Ser	Asn	Thr	Phe	Thr	Val	Ala	Val	Ser	Glu	Pro	Ile	Gln	Thr		
			740					745					750				
Ile	Asp	Ser	Val	Asn	Phe	Thr	Phe	Asp	Lys	Gln	Gly	Ile	Val	Ile	Lys		
	755						760					765					
Glu	Asp	Ile	Glu	Asn	Arg	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Ile		
	770					775					780						
Asn	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Gly	Gln	Ser	Tyr	Ser	Phe	Gln	Val	Thr	Ile		
785					790					795					800		
Gln	Asp																

<210> 252

<211> 517

5 <212> PRT

<213> *Synechococcus* sp. (cepa RCC307)

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 252

Met	Gly	Ala	Pro	Ala	Ile	Pro	Lys	Val	Pro	Arg	Ser	Pro	Ser	Lys	Ser		
1				5					10					15			
Glu	His	Thr	Thr	Arg	Pro	Asn	Ser	Gly	Glu	Ser	Glu	Val	Val	Arg	Gln		
			20					25					30				

Ala Glu Glu Leu Phe Glu Gln Thr Leu Val Asn Val Arg Gly Gln Leu
35 40 45
Ala Gly Ala Val Ala Ala Leu Glu Ser Ser Val His Asp Ser Glu Leu
50 55 60
Asn Tyr Gly Glu Ile Phe Leu Arg Asp Asn Val Pro Val Met Val Tyr
65 70 75 80
Leu Leu Leu Arg Gly Arg Phe Glu Ile Val Arg His Phe Leu Asp Leu
85 90 95
Cys Leu Glu Leu Gln Ser Arg Ser Tyr Arg Thr Arg Gly Val Phe Pro
100 105 110
Thr Ser Phe Val Glu Glu Asp Asp Lys Ile Leu Ala Asp Tyr Gly Gln
115 120 125
Arg Ser Ile Gly Arg Ile Thr Ser Val Asp Ala Ser Leu Trp Trp Pro
130 135 140
Val Leu Cys Trp Met Tyr Val Arg Ala Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Gly
145 150 155 160
Thr Ser Pro Lys Val Gln Arg Ala Val Gln Leu Leu Asp Leu Val
165 170 175
Leu Gln Pro Ser Phe Tyr Glu Pro Pro Val Leu Phe Val Pro Asp Cys
180 185 190
Ala Phe Met Ile Asp Arg Pro Met Asp Val Trp Gly Ala Pro Leu Glu
195 200 205
Val Glu Val Leu Leu Phe Gly Cys Leu Lys Ser Cys Cys Gln Leu Met
210 215 220
Ser Leu Val Glu Gly Gly His Gly Gly Pro Leu Ile Gln Gln Arg
225 230 235 240
Leu Glu Leu Thr Arg Thr Trp Met Arg Asp Leu Arg Val Tyr Leu Leu
245 250 255
Asn His Tyr Trp Val Thr Ser Lys Thr Met Gln Val Leu Arg Arg Arg
260 265 270
Pro Thr Glu Gln Tyr Gly Asp Tyr Gln Ser Arg Asn Glu Phe Asn Val
275 280 285
Gln Pro Glu Val Ile Pro His Trp Leu Gln Glu Trp Leu Asp Asp Arg
290 295 300
Gly Gly Tyr Leu Ile Gly Asn Met Arg Thr Gly Arg Pro Asp Phe Arg
305 310 315 320
Phe Tyr Ser Leu Gly Asn Ala Leu Gly Ser Leu Phe Gly Leu Leu Thr
325 330 335
Gly Pro Gln Gln Leu Ala Leu Phe Arg Leu Val Ile His Asn Arg Gln
340 345 350
His Leu Met Ala Glu Met Pro Met Arg Ile Cys His Pro Pro Met Asp
355 360 365
Gln Asp Glu Trp Ile Thr Asn Thr Gly Met Asp Pro Lys Asn Trp Pro
370 375 380
Trp Ser Tyr His Asn Gly Gly His Trp Pro Ser Leu Leu Trp Pro Met
385 390 395 400
Ala Ala Ala Val Leu Met His Gln Arg Leu Tyr Pro Asn Asp Asp Leu
405 410 415
Leu Leu Leu Gly Gln Thr Arg Thr Met Leu Glu Glu Cys Tyr Trp Gln
420 425 430
Gln Leu Asn Gln Leu Pro Arg Gln Gln Trp Ala Glu Tyr Phe Asp Gly
435 440 445
Pro Thr Gly Thr Trp Val Gly Gln Gln Ala Arg Ile Asn Gln Thr Trp
450 455 460
Thr Ile Val Gly Phe Leu Leu His His Leu Met Arg Lys Ala Pro
465 470 475 480
Gln Asp Val Lys Leu Leu Asp Leu Asp Asp Val Gly Pro Leu Arg Leu
485 490 495
Ser Phe Gln Asp Gln His Glu Lys Ser Ser Thr Asp Glu Arg Lys Ser
500 505 510
Phe Leu Lys Asn Tyr
515

<210> 253

<211> 1021

5 <212> PRT

<213> condroitina-sulfato-ABC endoliasa de Proteus vulgaris

<220>

<223> Hialuronano liasa

10

<400> 253

```

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

```


			420						425						430			
Asp	Met	Lys	Val	Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Asp	Leu	Asp	Tyr	Phe	Asn	Thr			
		435					440					445						
Leu	Ser	Arg	Gln	His	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Glu	Pro	Asp	Asp	Gln				
	450					455				460								
Lys	Arg	Ile	Asn	Leu	Val	Asn	Thr	Phe	Ser	His	Tyr	Ile	Thr	Gly	Ala			
465					470					475				480				
Leu	Thr	Gln	Val	Pro	Gly	Gly	Lys	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Asp	Gly				
				485				490						495				
Thr	Ala	Trp	Arg	His	Glu	Gly	Asn	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Ser	Phe	Pro	Ala			
			500					505					510					
Phe	Lys	Asn	Ala	Ser	Gln	Leu	Ile	Tyr	Leu	Leu	Arg	Asp	Thr	Pro	Phe			
		515					520					525						
Ser	Val	Gly	Glu	Ser	Gly	Trp	Asn	Asn	Leu	Lys	Lys	Ala	Met	Val	Ser			
	530					535					540							
Ala	Trp	Ile	Tyr	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Gly	Leu	Pro	Leu	Ala	Gly	Arg			
545					550					555				560				
His	Pro	Phe	Asn	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Val	Ala	Gln	Gly	Tyr	Tyr			
				565					570					575				
Trp	Leu	Ala	Met	Ser	Ala	Lys	Ser	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	Leu	Ala	Ser			
			580					585					590					
Ile	Tyr	Leu	Ala	Ile	Ser	Asp	Lys	Thr	Gln	Asn	Glu	Ser	Thr	Ala	Ile			
		595					600					605						
Phe	Gly	Glu	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala	Ser	Leu	Pro	Gln	Gly	Phe	Tyr	Ala			
	610					615					620							
Phe	Asn	Gly	Gly	Ala	Phe	Gly	Ile	His	Arg	Trp	Gln	Asp	Lys	Met	Val			
625					630					635				640				
Thr	Leu	Lys	Ala	Tyr	Asn	Thr	Asn	Val	Trp	Ser	Ser	Glu	Ile	Tyr	Asn			
				645					650					655				
Lys	Asp	Asn	Arg	Tyr	Gly	Arg	Tyr	Gln	Ser	His	Gly	Val	Ala	Gln	Ile			
		660						665					670					
Val	Ser	Asn	Gly	Ser	Gln	Leu	Ser	Gln	Gly	Tyr	Gln	Gln	Glu	Gly	Trp			
		675					680					685						
Asp	Trp	Asn	Arg	Met	Glu	Gly	Ala	Thr	Thr	Ile	His	Leu	Pro	Leu	Lys			
	690					695					700							
Asp	Leu	Asp	Ser	Pro	Lys	Pro	His	Thr	Leu	Met	Gln	Arg	Gly	Glu	Arg			
705					710					715				720				
Gly	Phe	Ser	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Glu	Gly	Gln	Tyr	Gly	Met	Met	Ala			
				725					730					735				
Phe	Asn	Leu	Ile	Tyr	Pro	Ala	Asn	Leu	Glu	Arg	Phe	Asp	Pro	Asn	Phe			
			740					745					750					
Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Val	Leu	Ala	Ala	Asp	Asn	His	Leu	Ile	Phe	Ile			
		755						760										

Ser	Ile	Glu	Asp	Lys	Trp	Ile	Lys	Lys	Val	Asn	Lys	Pro	Ala	Ile	Val
930						935				940					
Met	Thr	His	Arg	Gln	Lys	Asp	Thr	Leu	Ile	Val	Ser	Ala	Val	Thr	Pro
945					950					955					960
Asp	Leu	Asn	Met	Thr	Arg	Gln	Lys	Ala	Ala	Thr	Pro	Val	Thr	Ile	Asn
				965					970					975	
Val	Thr	Ile	Asn	Gly	Lys	Trp	Gln	Ser	Ala	Asp	Lys	Asn	Ser	Glu	Val
			980					985				990			
Lys	Tyr	Gln	Val	Ser	Gly	Asp	Asn	Thr	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
		995					1000					1005			
Phe	Gly	Ile	Pro	Gln	Glu	Ile	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Pro			
1010						1015					1020				

<210> 254
 <211> 684
 5 <212> PRT
 <213> Pedobacter heparinus

<220>
 <223> condroitina AC liasa

10
 <400> 254

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

Glu Pro Tyr His His Gln Phe Trp Asn Gly Asp Tyr Val Gln His Leu
325 330 335
Arg Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Val Arg Met Val Ser Lys Arg Thr Arg
340 345 350
Arg Ser Glu Ser Gly Asn Lys Glu Asn Leu Leu Gly Arg Tyr Leu Ser
355 360 365
Asp Gly Ala Thr Asn Ile Gln Leu Arg Gly Pro Glu Tyr Tyr Asn Ile
370 375 380
Met Pro Val Trp Glu Trp Asp Lys Ile Pro Gly Ile Thr Ser Arg Asp
385 390 395 400
Tyr Leu Thr Asp Arg Pro Leu Thr Lys Leu Trp Gly Glu Gln Gly Ser
405 410 415
Asn Asp Phe Ala Gly Gly Val Ser Asp Gly Val Tyr Gly Ala Ser Ala
420 425 430
Tyr Ala Leu Asp Tyr Asp Ser Leu Gln Ala Lys Lys Ala Trp Phe Phe
435 440 445
Phe Asp Lys Glu Ile Val Cys Leu Gly Ala Gly Ile Asn Ser Asn Ala
450 455 460
Pro Glu Asn Ile Thr Thr Thr Leu Asn Gln Ser Trp Leu Asn Gly Pro
465 470 475 480
Val Ile Ser Thr Ala Gly Lys Thr Gly Arg Gly Lys Ile Thr Thr Phe
485 490 495
Lys Ala Gln Gly Gln Phe Trp Leu Leu His Asp Ala Ile Gly Tyr Tyr
500 505 510
Phe Pro Glu Gly Ala Asn Leu Ser Leu Ser Thr Gln Ser Gln Lys Gly
515 520 525
Asn Trp Phe His Ile Asn Asn Ser His Ser Lys Asp Glu Val Ser Gly
530 535 540
Asp Val Phe Lys Leu Trp Ile Asn His Gly Ala Arg Pro Glu Asn Ala
545 550 555 560
Gln Tyr Ala Tyr Ile Val Leu Pro Gly Ile Asn Lys Pro Glu Glu Ile
565 570 575
Lys Lys Tyr Asn Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu Ala Asn Thr Asn Gln
580 585 590
Leu Gln Ala Val Tyr His Gln Gln Leu Asp Met Val Gln Ala Ile Phe
595 600 605
Tyr Thr Ala Gly Lys Leu Ser Val Ala Gly Ile Glu Ile Glu Thr Asp
610 615 620
Lys Pro Cys Ala Val Leu Ile Lys His Ile Asn Gly Lys Gln Val Ile
625 630 635 640
Trp Ala Ala Asp Pro Leu Gln Lys Glu Lys Thr Ala Val Leu Ser Ile
645 650 655
Arg Asp Leu Lys Thr Gly Lys Thr Asn Arg Val Lys Ile Asp Phe Pro
660 665 670
Gln Gln Glu Phe Ala Gly Ala Thr Val Glu Leu Lys
675 680

<210> 255

<211> 844

5 <212> PRT

<213> Victivallis vadensis ATCC BAA-548

<220>

<223> condroitina AC liasa

10

<400> 255

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

Ala	Ile	Pro	Ala	Asp	Ala	Pro	Glu	Ile	Ser	Arg	Arg	Asn	Thr	Ala	Asp
50					55						60				
Thr	Pro	Val	Gly	Leu	Thr	Cys	Phe	Glu	Gly	Gln	Pro	Ile	Glu	Phe	Ser
65					70					75					80
Ile	Arg	Leu	Arg	Asn	Ser	Gly	Ile	Ser	Arg	Pro	Asp	Asn	Leu	His	Asn
				85					90					95	
Gly	Ile	Lys	Phe	Gln	Leu	Tyr	Phe	Arg	Asp	Gly	Asn	Gly	Thr	Glu	Arg
			100					105					110		
Trp	Thr	Gln	Ala	Glu	Ile	Pro	His	Glu	Pro	Phe	Pro	Trp	Arg	Arg	Phe
			115				120					125			
Arg	Phe	Ser	Glu	Arg	Ile	Pro	Ala	Asp	Ala	Thr	Ser	Gly	Thr	Leu	Arg
			130			135					140				
Leu	Gly	Leu	Gln	Gly	Ser	Ser	Gly	Asn	Val	Glu	Phe	Asp	Leu	Asp	Ser
145					150					155					160
Leu	Gln	Ile	Arg	Pro	Leu	Asp	Pro	Glu	Leu	Ser	Pro	Val	Pro	Pro	Thr
				165				170					175		
Pro	Glu	Gln	Ile	Arg	Glu	Cys	Glu	Leu	Ile	Glu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ala
			180				185						190		
Gly	Leu	Pro	Ala	Gln	Gln	Pro	Pro	Gly	Pro	Glu	Val	Lys	Lys	Leu	
		195				200					205				
Leu	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Asp	Gly	Thr	Phe	Arg	Asp	Leu	Asp	Tyr	Ser
210					215						220				
Ala	Arg	Asn	Arg	Ser	Ile	Trp	Pro	Ala	Ala	Arg	His	Leu	Lys	Arg	Thr
225					230					235					240
Phe	Glu	Leu	Ala	Leu	Ala	Arg	Ala	Thr	Pro	Gly	His	Ala	Leu	Tyr	Arg
			245					250					255		
Asp	Pro	Ala	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Arg	Lys	Ala	Val	Ala	Trp	Trp	Ala
			260				265						270		
Glu	Arg	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Asn	Trp	Trp	Trp	Asn	Asp	Met	Tyr	Val
		275				280					285				
Pro	Lys	Ile	Leu	Gly	Asn	Ile	Leu	Leu	Leu	Ser	Pro	Glu	Leu	Phe	Pro
		290			295						300				
Asp	Gly	Pro	Arg	Arg	Arg	Ala	Ala	Leu	Asn	Val	Cys	Arg	Gln	Ala	Cys
305					310					315					320
Phe	Leu	Ser	Arg	Tyr	Thr	Gly	Asn	Asn	Arg	Val	Phe	Ile	Ala	Ala	Asn
				325					330					335	
Ile	Phe	Cys	Arg	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Asn	Leu	Pro	Val	Met	Asp	Arg
			340				345						350		
Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Ser	Glu	Glu	Ile	Arg	Phe	Ala	Pro	Ala	Glu	His
		355					360					365			
Lys	Thr	Ala	Trp	Ser	Phe	Gly	Gly	Ile	Arg	Ala	Asp	Gly	Cys	Tyr	His
		370				375					380				
Gln	His	Gly	Pro	Gln	Ile	Gln	Phe	Gly	Asn	Tyr	Gly	Gly	Glu	Phe	Leu
385					390					395					400
Ala	Asn	Ile	Ala	Tyr	Trp	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	His	Trp	Glu
			405						410					415	
Leu	Ser	Pro	Glu	Gln	Trp	Arg	Ile	Met	Arg	His	Leu	Thr	Phe	Asn	Gly
			420					425					430		
Phe	Gln	Trp	Val	Leu	Trp	Arg	Gly	Arg	Met	Asp	Leu	Leu	Ala	Cys	Gly
			435				440					445			
Arg	Gln	Leu	Gly	Arg	Asn	Ala	Ala	Glu	Thr	Lys	Gly	Glu	Arg	Thr	Leu
			450			455					460				
Asn	Ala	Phe	Ala	Gln	Leu	Arg	Asn	Ala	Asp	Pro	Gly	Asp	Arg	Ala	Pro
465					470					475					480
Tyr	Asp	Ala	Ala	Leu	Arg	Arg	Asn	Arg	Asp	Gly	Glu	Asn	Thr	Leu	Thr
			485						490					495	
Gly	Asn	Arg	His	Phe	Trp	Asn	Ser	Asp	Tyr	Met	Val	His	Arg	Arg	Pro
			500					505					510		
Thr	Trp	Tyr	Ala	Ser	Val	Arg	Met	Asn	Ser	Val	Arg	Val	Arg	Pro	Ile
		515					520					525			
Glu	Asp	Asp	Thr	Asn	Trp	Asp	Asn	Ala	Leu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ser	Asp
		530				535					540				
Gly	Ala	Cys	Leu	Val	Met	Arg	Ser	Gly	Arg	Glu	Tyr	Glu	Asn	Ile	Thr

```

545          550          555          560
Ala Cys Trp Asp Trp Thr Arg Leu Pro Gly Thr Thr Leu Pro Lys Thr
      565
Pro Val Tyr Thr Gly Glu Asp Ala Arg Arg Phe Gly Leu Lys Ile Gly
      580          585          590
Gly Gly Asp Leu Pro Arg Trp Thr His Ser Arg Asn Trp Arg Gln Leu
      595          600          605
Gly Glu Thr Gly Phe Val Gly Gly Val Thr Asp Gly Glu Arg Gly Ala
      610          615          620
Ala Val Tyr Thr Gln Asp Leu Asp Gly Val Arg Ala Arg Lys Ala Trp
      625          630          635          640
Phe Phe Asp Arg Asp Ala Ile Tyr Cys Leu Gly Ser Gly Ile Thr Ser
      645          650          655
Thr Ser Pro Tyr Glu Val Ala Thr Thr Val Asn Ser Cys Leu Arg Asn
      660          665          670
Gly Glu Ile Gln Gln Gly Asp Gly Trp Phe Arg His Asp Gly Ile Gly
      675          680          685
Tyr Arg Gly Glu Asn Leu Lys Leu Thr Ala Gly Pro Arg Thr Gly Asp
      690          695          700
Trp Arg Tyr Val Glu Gly Gly Leu Thr Arg Pro Val Pro Glu Thr Lys
      705          710          715          720
Glu Leu Phe Thr Leu Thr Val Glu His Gly Val Lys Pro Arg Asn Ala
      725          730          735
Ser Tyr Ile Tyr Thr Ile Leu Pro Gly Ala Thr Pro Glu Glu Thr Ala
      740          745          750
Gly Thr Pro Pro Gly Arg Val Leu Arg Asn Thr Pro Glu Cys Gln Ala
      755          760          765
Val Glu Phe Ala Asp Gly Val Arg Ala Ala Ile Phe Tyr Glu Pro Gly
      770          775          780
Arg Leu Asp Asp Phe Glu Thr Asp Thr Pro Gly Val Phe Leu Ile Gly
      785          790          795          800
Lys Gly Thr Val His Ala Ala Asp Pro Thr Gly Arg His Ser Ser Phe
      805          810          815
Thr Leu Lys Leu Asn Gly Val Ser Arg Lys Val Pro Leu Pro Ala Gly
      820          825          830
Glu Phe Ala Gly Gln Ser Val Lys Ile Val Leu Lys
      835          840

```

<210> 256
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursora de PH20 1-465

<400> 256

```

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

```

```

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

```

<210> 257
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursora de PH20 1-466

<400> 257

```

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

```

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

<210> 258
 <211> 467
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursora de PH20 1-467

10 <400> 258

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

<210> 259

<211> 468

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursora de PH20 1-468

10

<400> 259

```

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

```

5 <210> 260
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-469

<400> 260

```

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

```

5 <210> 261
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-470

<400> 261

```

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

```

5 <210> 262
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-471

<400> 262

```

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

```

5 <210> 263
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-472

<400> 263

```

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

```

5 <210> 264
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-473

<400> 264

```

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

```

5 <210> 265
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-474

<400> 265

```

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

```

5 <210> 266
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-475

<400> 266

```

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

```

<210> 267

5 <211> 476

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> Precursora de PH20 1-476

<400> 267

```

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

```

5 <210> 268
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-477

<400> 268

```

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

```

5 <210> 269
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-478

<400> 269

```

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

```

5 <210> 270
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-479

<400> 270

```

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

```

5 <210> 271
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-480

<400> 271

```

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

```

5 <210> 272
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-481

<400> 272

```

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

```

5 <210> 273
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Precursora de PH20 1-482

<400> 273

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

5

<210> 274

<211> 483

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursora de PH20 1-483

<400> 274

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

<210> 275

<211> 484

<212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 220 \rangle$

<223> Precursora de PH20 1-484

5

<400> 275

[illegible]

10 <210> 276

<211> 485
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <223> Precursora de PH20 1-485

<400> 276

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

```

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

```

<210> 277

<211> 486

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursora de PH20 1-486

10

<400> 277

```

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

```

ES 2 727 137 T3

```

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

```

<210> 278

<211> 487

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursora de PH20 1-487

10

<400> 278

```

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

```

ES 2 727 137 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
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser
 485

<210> 279
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Precursora de PH20 1-488

<400> 279

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

```

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

```

<210> 280

<211> 489

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursora de PH20 1-489

10

<400> 280

ES 2 727 137 T3

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

<210> 281

<211> 490

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Precursora de PH20 1-490

<400> 281

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

5

<210> 282

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR1 de VH de Tremelimumab
 5 <400> 282
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
 1 5 10
 <210> 283
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <223> CDR2 de VH de Tremelimumab
 <400> 283
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 20 <210> 284
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <223> CDR3 de VH de Tremelimumab
 <400> 284
 Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15
 30 <210> 285
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <223> CDR1 de VH de Tremelimumab
 <400> 285
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp
 40 1 5 10
 <210> 286
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR2 de VL de Tremelimumab
 50 <400> 286
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 287
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR3 de VL de Tremelimumab
 60

```

<400> 287
                                Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
                                1          5

5  <210> 288
    <211> 330
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

10 <220>
    <223> región constante de la cadena pesada de IgG1

    <220>
    <221> DOMINIO
    <222> (1)...(98)
15 <223> CH1

    <220>
    <221> DOMINIO
    <222> (99)...(113)
20 <223> región bisagra

    <220>
    <221> DOMINIO
    <222> (114)...(223)
25 <223> CH2

    <220>
    <221> DOMINIO
    <222> (224)...(328)
30 <223> CH3

<400> 288
      Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
      1          5          10          15
      Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20          25          30

```

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

<210> 289

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio constante de la cadena pesada de Cetuximab R216

10 <220>

<221> DOMINIO

<222> (1)...(98)

<223> CH1

15 <220>

<221> DOMINIO

<222> (99)...(113)

<223> región bisagra

20 <220>

<221> DOMINIO

<222> (114)...(223)

<223> CH2

25 <220>

<221> DOMINIO

<222> (224)...(328)

<223> CH3

30 <400> 289

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

<210> 290
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> dominio constante de la cadena pesada de Cetuximab R216 Ins222PKS

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1)...(98)
 <223> CH1

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (99)...(116)
 <223> región bisagra

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (117)...(226)
 <223> CH2

<220>
 <221> DOMINIO

<222> (227)...(331)

<223> CH3

<400> 290

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

5

<210> 291

<211> 330

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio constante de la cadena pesada de Cetuximab K216

15

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)...(98)

<223> CH1

20

<220>

<221> DOMINIO

<222> (99)...(113)

<223> región bisagra

25

<220>

<221> DOMINIO

<222> (114)...(223)

<223> CH2

<220>

<221> DOMINIO

5 <222> (224)...(328)

<223> CH3

<400> 291

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

10

<210> 292

<211> 330

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio constante de la cadena pesada de Cetuximab R216 E358 M360

20 <220>

<221> DOMINIO

<222> (1)...(98)

<223> CH1

25 <220>

<221> DOMINIO

<222> (99)...(113)

<223> región bisagra

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (114)...(223)
 <223> CH2

5

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (224)...(328)
 <223> CH3

10

<400> 292

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

15

<210> 293
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <223> IgG2 humana

25

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1)...(98)
 <223> CH1

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (99)...(110)
 <223> región bisagra

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (111)...(219)
 <223> CH2

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (220)...(326)
 <223> CH3

<400> 293

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

<210> 294
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> IgG3 humana

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1)...(98)
 <223> CH1
 5
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (99)...(160)
 <223> región bisagra
 10
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (161)...(270)
 <223> CH2
 15
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (271)...(386)
 <223> CH3
 20
 <400> 294
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[illegible]

<210> 295
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IgG4 humana

<220>
<221> DOMINIO
<222> (1)...(98)
<223> CH1

<220>
<221> DOMINIO
<222> (99)...(110)
<223> región bisagra

<220>
<221> DOMINIO
<222> (111)...(220)
<223> CH2

<220>

<221> DOMINIO
<222> (221)...(327)
<223> CH3

5 <400> 295

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

<210> 296
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio constante de la cadena ligera kappa humana

<400> 296

ES 2 727 137 T3

```

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

```

<210> 297
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> dominio constante de la cadena ligera lambda humana

```

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

```

<210> 298
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> dominio constante de la cadena ligera kappa de Cetuximab A213

```

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

```

<210> 299
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<300>

<308> UniProt: Q15116.3

<309> 09-07-2014

5 <400> 299

```

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

```

<210> 300

<211> 371

10 <212> PRT

<213> bacteriófago H4489A de Streptococcus pyogenes

<220>

<223> hialuronidasa

15

<400> 300

```

Met Thr Glu Asn Ile Pro Leu Arg Val Gln Phe Lys Arg Met Ser Ala

```

```

1           5           10           15
Asp Glu Trp Ala Arg Ser Asp Val Ile Leu Leu Glu Gly Glu Ile Gly
20
Phe Glu Thr Asp Thr Gly Phe Ala Lys Phe Gly Asp Gly Gln Asn Thr
35
Phe Ser Lys Leu Lys Tyr Leu Thr Gly Pro Lys Gly Pro Lys Gly Asp
50
Thr Gly Leu Gln Gly Lys Thr Gly Gly Thr Gly Pro Arg Gly Pro Ala
65
Gly Lys Pro Gly Thr Thr Asp Tyr Asp Gln Leu Gln Asn Lys Pro Asp
85
Leu Gly Ala Phe Ala Gln Lys Glu Glu Thr Asn Ser Lys Ile Thr Lys
100
Leu Glu Ser Ser Lys Ala Asp Lys Ser Ala Val Tyr Ser Lys Ala Glu
115
Ser Lys Ile Glu Leu Asp Lys Lys Leu Ser Leu Thr Gly Gly Ile Val
130
Thr Gly Gln Leu Gln Phe Lys Pro Asn Lys Ser Gly Ile Lys Pro Ser
145
Ser Ser Val Gly Gly Ala Ile Asn Ile Asp Met Ser Lys Ser Glu Gly
165
Ala Ala Met Val Met Tyr Thr Asn Lys Asp Thr Thr Asp Gly Pro Leu
180
Met Ile Leu Arg Ser Asp Lys Asp Thr Phe Asp Gln Ser Ala Gln Phe
195
Val Asp Tyr Ser Gly Lys Thr Asn Ala Val Asn Ile Val Met Arg Gln
210
Pro Ser Ala Pro Asn Phe Ser Ser Ala Leu Asn Ile Thr Ser Ala Asn
225
Glu Gly Gly Ser Ala Met Gln Ile Arg Gly Val Glu Lys Ala Leu Gly
245
Thr Leu Lys Ile Thr His Glu Asn Pro Asn Val Glu Ala Lys Tyr Asp
260
Glu Asn Ala Ala Ala Leu Ser Ile Asp Ile Val Lys Lys Gln Lys Gly
275
Gly Lys Gly Thr Ala Ala Gln Gly Ile Tyr Ile Asn Ser Thr Ser Gly
290
Thr Ala Gly Lys Met Leu Arg Ile Arg Asn Lys Asn Glu Asp Lys Phe
305
Tyr Val Gly Pro Asp Gly Gly Phe His Ser Gly Ala Asn Ser Thr Val
325
Ala Gly Asn Leu Thr Val Lys Asp Pro Thr Ser Gly Lys His Ala Ala
340
Thr Lys Asp Tyr Val Asp Glu Lys Ile Ala Glu Leu Lys Lys Leu Ile
355
Leu Lys Lys
370

```

<210> 301
 <211> 1628
 5 <212> PRT
 <213> Clostridium perfringens

<220>
 <223> hialuronidasa

10 <400> 301

```

Met Asn Lys Asn Ile Arg Lys Ile Ile Thr Ser Thr Val Leu Ala Ala
1           5           10           15
Met Thr Ile Ser Val Leu Pro Ser Asn Leu Val Val Phe Ala Thr Asp
20
Gly Ile Thr Glu Asn Phe Tyr Glu Ile Tyr Pro Lys Pro Gln Glu Ile
25

```

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

Glu	Leu	Ile	Ala	Glu	Phe	Thr	Asn	Leu	Gln	Lys	Ala	Ala	Asp	Tyr	Tyr
545					550					555					560
Lys	Asn	Asn	Pro	Gly	Asn	Glu	Arg	Thr	Arg	Asp	Gln	Ile	Ile	Tyr	Trp
				565						570					575
Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	Asp	Thr	Met	Asp	Ala	Ala	Ile	Gly	Tyr	Leu	Lys
			580					585						590	
Ser	Ala	Ile	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Asp	Asp	Glu	Ala	Ala	Trp	Ala	Asn
			595					600					605		
Tyr	Ser	Glu	Ala	Gln	Gly	Ala	Phe	Glu	Lys	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Phe
			610				615					620			
His	Tyr	Val	Asp	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Glu	Val	Gly	Val	Gln	His	Ile
625						630					635				640
Val	Pro	Phe	Ile	Lys	Ser	Met	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Val	Ile	Gly
				645						650					655
Ser	Ile	Val	Asp	Pro	Asn	Arg	Ile	Ile	Ala	Thr	Tyr	Ile	Ser	Asn	Arg
			660							665				670	
Gln	Asp	Ala	Pro	Thr	Gly	Asn	Pro	Asp	Asn	Ile	Phe	Asp	Asn	Asn	Ala
			675					680				685			
Ser	Thr	Glu	Leu	Val	Tyr	Lys	Asn	Pro	Asn	Arg	Ile	Asp	Val	Gly	Thr
			690			695						700			
Tyr	Val	Gly	Val	Lys	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ile	Thr	Leu	Asn	Asn	Val	Glu
705					710					715					720
Phe	Leu	Met	Gly	Ala	Asn	Ser	Asn	Pro	Asn	Asp	Thr	Met	Gln	Lys	Ala
				725						730					735
Lys	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Asp	Gly	Arg	Glu	Trp	Ile	Asp	Leu	Glu	Glu
			740					745					750		
Gly	Val	Glu	Tyr	Thr	Met	Pro	Gly	Ala	Ile	Lys	Val	Glu	Asn	Leu	Asp
			755				760						765		
Leu	Lys	Val	Arg	Gly	Val	Arg	Leu	Ile	Ala	Thr	Glu	Ala	Arg	Glu	Asn
			770			775					780				
Thr	Trp	Leu	Gly	Val	Arg	Asp	Ile	Asn	Val	Asn	Lys	Lys	Glu	Asp	Ser
785				790						795					800
Asn	Ser	Gly	Val	Glu	Phe	Asn	Pro	Ser	Leu	Ile	Arg	Ser	Glu	Ser	Trp
				805						810					815
Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Asn	Glu	Ala	Asn	Leu	Leu	Asp	Gly	Asp	Asp	Asn
			820					825					830		
Thr	Gly	Val	Trp	Tyr	Lys	Thr	Leu	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Leu	Ala	Gly
			835				840					845			
Glu	Phe	Ile	Gly	Leu	Asp	Leu	Gly	Lys	Glu	Ile	Lys	Leu	Asp	Gly	Ile
			850			855					860				
Arg	Phe	Val	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Asp	Lys	Trp	Asn
865				870						875					880
Lys	Phe	Lys	Leu	Glu	Tyr	Ser	Leu	Asp	Asn	Glu	Ser	Trp	Thr	Thr	Ile
				885						890				895	
Lys	Glu	Tyr	Asp	Lys	Thr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly	Lys	Asp	Val	Ile	Glu
			900					905					910		
Glu	Ser	Phe	Glu	Thr	Pro	Ile	Ser	Ala	Lys	Tyr	Ile	Arg	Leu	Thr	Asn
			915				920					925			
Met	Glu	Asn	Ile	Asn	Lys	Trp	Leu	Thr	Phe	Ser	Glu	Phe	Ala	Ile	Ile
			930			935						940			
Ser	Asp	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Gly	Asn	Lys	Glu	Asn	Val	Tyr	Thr	Asn
945				950						955					960
Thr	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Asp	Val	Thr	Lys	Leu
			965						970					975	
Ile	Pro	Thr	Asp	Asp	Ile	Ser	Leu	Asn	His	Gly	Glu	Tyr	Ile	Gly	Val
			980					985					990		
Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Ile	Asn	Leu	Glu	Ile	Ser
			995				1000						1005		
Asn	Asp	Thr	Gly	Leu	Lys	Leu	Gln	Ser	Ser	Met	Asn	Gly	Val	Glu	Trp
			1010				1015					1020			
Thr	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Asn	Thr	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Tyr	Val	Arg
1025					1030					1035					1040
Leu	Ile	Asn	Thr	Ser	Asn	Glu	Ala	Val	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Lys	Phe

				1045					1050				1055		
Glu	Val	Asn	Ser	Asn	Glu	Val	Tyr	Glu	Pro	Ser	Leu	Val	Asp	Ala	Tyr
				1060					1065				1070		
Val	Gly	Asp	Asp	Gly	Ala	Lys	Lys	Ala	Val	Asp	Gly	Asp	Leu	Lys	Thr
				1075				1080					1085		
Arg	Val	Lys	Phe	Leu	Gly	Ala	Pro	Ser	Thr	Gly	Asp	Thr	Ile	Val	Tyr
				1090				1095					1100		
Asp	Leu	Gly	Gln	Glu	Ile	Leu	Val	Asp	Asn	Leu	Lys	Tyr	Val	Val	Leu
				1105				1110				1115			1120
Asp	Thr	Glu	Val	Asp	His	Val	Arg	Asp	Gly	Lys	Ile	Gln	Leu	Ser	Leu
				1125					1130						1135
Asp	Gly	Glu	Thr	Trp	Thr	Asp	Ala	Ile	Thr	Ile	Gly	Asp	Gly	Val	Glu
				1140					1145						1150
Asn	Gly	Val	Asp	Asp	Met	Phe	Ser	Thr	Pro	Leu	Lys	Asn	Gly	Tyr	Lys
				1155				1160					1165		
His	Gly	Asn	Gln	Ser	Gly	Gly	Ile	Val	Pro	Ile	Asp	Ser	Ala	Tyr	Val
				1170				1175					1180		
Glu	Gly	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Lys	Ala	Arg	Tyr	Val	Arg	Ile	Leu	Phe
				1185				1190							1200
Thr	Ala	Pro	Tyr	Arg	His	Arg	Trp	Thr	Val	Ile	Asn	Glu	Leu	Met	Ile
				1205					1210						1215
Asn	Asn	Gly	Glu	Tyr	Ile	Ser	Thr	Val	Asn	Asp	Pro	Thr	Tyr	Ile	Ser
				1220				1225							1230
Asn	Pro	Ile	Glu	Glu	Arg	Gly	Phe	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Asp	Gly
				1235				1240					1245		
Asn	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Lys	Pro	Asn	Thr	Asn	Asn	Gly	Glu	Ile	Ser
				1250				1255					1260		
Glu	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Ser	Glu	Lys	Thr	Asp	Val	Arg	Lys
				1265				1270							1280
Val	Thr	Ile	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Asn	Ala	Lys	Val	Met
				1285					1290						1295
Ala	Arg	Val	Gly	Asp	Gly	Ser	Glu	Asn	Val	Thr	Asp	Gln	Trp	Val	Gln
				1300				1305							1310
Leu	Gly	Thr	Leu	Ser	Asn	Ser	Leu	Asn	Glu	Phe	Ile	Asn	Arg	Asp	Tyr
				1315				1320					1325		
Asn	Asn	Ile	Tyr	Glu	Ile	Lys	Ile	Glu	Trp	Thr	Asp	Val	Ala	Pro	Asn
				1330				1335					1340		
Ile	Tyr	Glu	Ile	Ile	Thr	Leu	Asn	Gln	Glu	Phe	Glu	Phe	Pro	Val	Asn
				1345				1350					1355		1360
Asp	Ser	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Asp	Glu	Leu	Ile	Asn	Leu	Ser	Gly	Asp
				1365				1370							1375
Glu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Phe	Glu	Thr	Leu	Lys	Glu	Ala	Leu	Asn	Glu
				1380				1385							1390
Ala	Lys	Ser	Ile	Leu	Asp	Asp	Ser	Asn	Ser	Ser	Gln	Lys	Lys	Ile	Asp
				1395				1400							1405
Lys	Ala	Leu	Glu	Lys	Leu	Asn	Lys	Ala	Glu	Glu	Arg	Leu	Asp	Leu	Arg
				1410				1415					1420		
Ala	Thr	Asp	Phe	Glu	Asp	Phe	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Leu	Gly	Asn	Ser
				1425				1430					1435		1440
Leu	Val	Glu	Glu	Glu	Tyr	Thr	Ala	Glu	Ser	Trp	Ala	Leu	Phe	Ser	Glu
				1445				1450							1455
Val	Leu	Glu	Ala	Ala	Asn	Glu	Ala	Asn	Lys	Asn	Lys	Ala	Asp	Tyr	Thr
				1460				1465							1470
Gln	Asp	Gln	Ile	Asn	Gln	Ile	Val	Ile	Asp	Leu	Asp	Ala	Ser	Ile	Lys
				1475				1480					1485		
Ala	Leu	Val	Lys	Glu	Thr	Pro	Glu	Val	Asp	Lys	Thr	Asn	Leu	Gly	Glu
				1490				1495					1500		
Leu	Ile	Asn	Gln	Gly	Lys	Ser	Leu	Leu	Asp	Glu	Ser	Val	Glu	Gly	Phe
				1505				1510					1515		1520
Asn	Val	Gly	Glu	Tyr	His	Lys	Gly	Ala	Lys	Asp	Gly	Leu	Thr	Val	Glu
				1525				1530							1535
Ile	Asn	Lys	Ala	Glu	Glu	Val	Phe	Asn	Lys	Glu	Asp	Ala	Thr	Glu	Glu
				1540				1545					1550		
Glu	Ile	Asn	Leu	Ala	Lys	Glu	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala	Ile	Ala	Arg	Phe
				1555				1560					1565		
Asn	Ser	Leu	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Thr	Gly	Asp	Phe	Asn	Gly	Asn	Gly
				1570				1575					1580		
Lys	Ile	Asp	Ile	Gly	Asp	Leu	Ala	Met	Val	Ser	Lys	Asn	Ile	Gly	Ser
				1585				1590					1595		1600
Thr	Thr	Asn	Thr	Ser	Leu	Asp	Leu	Asn	Lys	Asp	Gly	Ser	Ile	Asp	Glu
				1605				1610							1615
Tyr	Glu	Ile	Ser	Phe	Ile	Asn	His	Arg	Ile	Leu	Asn				
				1620				1625							

<210> 302
 <211> 1439
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <223> ADN que codifica la preproteína del gen 6 (TSG-6) estimulado por el factor de necrosis tumoral humano GI
 Núm. 315139000

10 <400> 302

agtcacattt	cagccactgc	tctgagaatt	tgtgagcagc	ccctaacagc	ctgttacttc	60
actacaactg	acgatatgat	catcttaatt	tacttatttc	tcttgctatg	ggaagacact	120
caaggatggg	gattcaagga	tggaattttt	cataactcca	tatggcttga	acgagcagcc	180
ggtgtgtacc	acagagaagc	acggtctggc	aaatacaagc	tcacctacgc	agaagctaag	240
gcggtgtgtg	aatttgaaag	cggccatctc	gcaacttaca	agcagctaga	ggcagccaga	300
aaaattggat	ttcatgtctg	tgctgctgga	tggatggcta	agggcagagt	tggatacccc	360
attgtgaagc	cagggcccaa	ctgtggattt	ggaaaaactg	gcattattga	ttatggaatc	420
cgtctcaata	ggagtgaag	atgggatgcc	tattgctaca	acccacacgc	aaaggagtgt	480
ggtggcgtct	ttacagatcc	aaagcaaatt	tttaaacttc	caggcttccc	aatgagtagc	540
gaagataacc	aaatctgcta	ctggcacatt	agactcaagt	atggtcagcg	tattcacctg	600
agtttttttag	attttgacct	tgaagatgac	ccaggttgct	tggctgatta	tgttgaaata	660
tatgacagtt	acgatgatgt	ccatggcttt	gtgggaagat	actgtggaga	tgagcttcca	720
gatgacatca	tcagtacagg	aaatgtcatg	accttgaagt	ttctaagtga	tgcttcagtg	780
acagctggag	gtttccaaat	caaatatggt	gcaatggatc	ctgtatccaa	atccagtcac	840
ggaaaaaata	caagtactac	ttctactgga	aataaaaaact	ttttagctgg	aagatttagc	900
cacttataaa	aaaaaaaaaa	aggatgatca	aaacacacag	tgtttatggt	ggaatctttt	960
ggaactcctt	tgatctcact	gttattatta	acatttattt	attatttttc	taaatgtgaa	1020
agcaatacat	aatttaggga	aaattggaaa	atataggaaa	ctttaaacga	gaaaatgaaa	1080
cctctcataa	tcccactgca	tagaaataac	aagcgttaac	attttcataat	ttttttcttt	1140
cagtcatttt	tctatttgtg	gtatatgtat	atatgtacct	atatgtattt	gcatttgaaa	1200
ttttggaatc	ctgctctatg	tacagttttg	tattatactt	tttaaatctt	gaactttata	1260
aacattttct	gaaatcattg	attattctac	aaaaacatga	ttttaaacag	ctgtaaaata	1320
ttctatgata	tgaatgtttt	atgcattatt	taagcctgtc	tctattgttg	gaatttcagg	1380
tcattttcat	aaatattgtt	gcaataaata	tccttgaaca	cacaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1439

<210> 303
 <211> 277
 <212> **PRT**
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <223> preproteína del gen 6 (TSG-6) estimulado por el factor de necrosis tumoral humano

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(17)
 <223> Secuencia señal

25 <300>

<308> UniProt: P98066.2
 <309> 09-07-2014

30 <400> 303

```

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

```

<210> 304

<211> 260

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> proteína del gen 6 (TSG-6) estimulado por el factor de necrosis tumoral humano

10

<400> 304

```

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

```

				85				90				95			
Gly	Ile	Arg	Leu	Asn	Arg	Ser	Glu	Arg	Trp	Asp	Ala	Tyr	Cys	Tyr	Asn
100								105				110			
Pro	His	Ala	Lys	Glu	Cys	Gly	Gly	Val	Phe	Thr	Asp	Pro	Lys	Gln	Ile
115								120				125			
Phe	Lys	Ser	Pro	Gly	Phe	Pro	Asn	Glu	Tyr	Glu	Asp	Asn	Gln	Ile	Cys
130				135				140							
Tyr	Trp	His	Ile	Arg	Leu	Lys	Tyr	Gly	Gln	Arg	Ile	His	Leu	Ser	Phe
145				150				155				160			
Leu	Asp	Phe	Asp	Leu	Glu	Asp	Asp	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Asp	Tyr	Val
165								170				175			
Glu	Ile	Tyr	Asp	Ser	Tyr	Asp	Asp	Val	His	Gly	Phe	Val	Gly	Arg	Tyr
180								185				190			
Cys	Gly	Asp	Glu	Leu	Pro	Asp	Asp	Ile	Ile	Ser	Thr	Gly	Asn	Val	Met
195				200				205							
Thr	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Asp	Ala	Ser	Val	Thr	Ala	Gly	Gly	Phe	Gln
210				215				220							
Ile	Lys	Tyr	Val	Ala	Met	Asp	Pro	Val	Ser	Lys	Ser	Ser	Gln	Gly	Lys
225				230				235				240			
Asn	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Asn	Lys	Asn	Phe	Leu	Ala	Gly	Arg
245								250				255			
Phe	Ser	His	Leu												
260															

<210> 305
<211> 93
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> dominio de enlace TSG-6

<400> 305

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

<210> 306
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> residuos de aa 35-129 de TSG-6 humano

<400> 306

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

<210> 307
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<220>
<223> dominio de enlace TSG-6 aa 36-129

<400> 307

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

10

<210> 308
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<220>
<223> dominio de enlace TSG-6 aa 36-132

<400> 308

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

25

<210> 309
<211> 93
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Variante K20A/K34A/K41A del dominio de enlace TSG-6

30

<400> 309

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

<210> 310
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> variante K21A/K35A/K42A del dominio de enlace TSG-6 aa 35-129

<400> 310

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

10

<210> 311
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <223> fragmento de la cadena pesada de IgG1

<400> 311

20

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

25 <210> 312
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Secuencia peptídica para la proteína de fusión TSG-6-LM-Fc

<400> 312

```

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

```

5

<210> 313

<211> 349

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TSG-6-LM-Fc/deltaHep (proteína)

15 <400> 313

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

<210> 314

<211> 1059

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión TSG-6-LM-Fc - Seq. de ADN con codones optimizados utilizada para la expresión de la proteína

<400> 314


```

gctagcatgg acatgcgtgt gccagctcag ctgctgggac tgctgctgct gtggctgcct 60
ggagctagag gagcagatat cgcaggcgtg taccacaggg aggcacggtc cggaaagtac 120
aaactgacct atgctgaagc aaaggccgtg tgcgagttcg aaggcggaca cctggctaca 180
tataagcagc tggagggccg tcgcaaaatc gggtttcacg tgtgcgcagc cggttggatg 240
gcaaaggggc gagtcggtta cccattgtg aaaccaggcc ccaactgtgg cttcggaag 300
actggcatca ttgactatgg aatcagactg aaccgcagcg agcgatggga cgcatactgc 360
tataataaccg gtgataagac tcacacctgc ccccttgtc ctgcccaga actgctgggg 420
ggtccttccg tgttcctgtt tccacccaag ccaaaagaca ccctgatgat ttctaggaca 480
cctgaggtca cttgcgtggt cgtggacgtg agtcacgaag atccagaagt caagtttaac 540
tggtagctgg atggcgtcga agtgcataat gccaaagaca aacctcgtga ggaacagtac 600
aattctactt ataggtcgtg gtagtgcctg accgtgctgc atcaggattg gctgaacggg 660
aaggagtata agtgcaaagt gtcaaataag gctctgcccg cactatcga gaaaacaatt 720
tccaaggcca aaggccagcc acgggaaccc caggtgtaca ctctgcctcc atccagagag 780
gaaatgacca aaaaccaggc cagcctgaca tgtctggtga aggggttcta tccaagcgac 840
atcgctgtgg agtggaatc taatggtcag cccgagaaca attacaagac cacaccccct 900
gtcctggact ccgatggcag cttctttctg tattcaaagc tgacagtgga taaatcccgc 960
tggcagcagg gaaacgtctt ctctgtagc gtgatgcatg aggtctctgca caatcattac 1020
actcagaagt ctctgagtct gtcaccaggg aaaggatcc 1059

```

<210> 315

<211> 1059

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> TSG-6-LM-Fc/deltaHep (ADN)

<400> 315

```

gctagcatgg acatgcgtgt gccagctcag ctgctgggac tgctgctgct gtggctgcct 60
ggagctagag gagcagatat cgcaggcgtg taccacaggg aggcacggtc cggaaagtac 120
aaactgacct atgctgaagc agcggccgtg tgcgagttcg aaggcggaca cctggctaca 180
tatgcgcagc tggagggccg tcgcgcaatc gggtttcacg tgtgcgcagc cggttggatg 240
gcaaaggggc gagtcggtta cccattgtg aaaccaggcc ccaactgtgg cttcggaag 300
actggcatca ttgactatgg aatcagactg aaccgcagcg agcgatggga cgcatactgc 360
tataataaccg gtgataagac tcacacctgc ccccttgtc ctgcccaga actgctgggg 420
ggtccttccg tgttcctgtt tccacccaag ccaaaagaca ccctgatgat ttctaggaca 480
cctgaggtca cttgcgtggt cgtggacgtg agtcacgaag atccagaagt caagtttaac 540
tggtagctgg atggcgtcga agtgcataat gccaaagaca aacctcgtga ggaacagtac 600
aattctactt ataggtcgtg gtagtgcctg accgtgctgc atcaggattg gctgaacggg 660
aaggagtata agtgcaaagt gtcaaataag gctctgcccg cactatcga gaaaacaatt 720
tccaaggcca aaggccagcc acgggaaccc caggtgtaca ctctgcctcc atccagagag 780
gaaatgacca aaaaccaggc cagcctgaca tgtctggtga aggggttcta tccaagcgac 840
atcgctgtgg agtggaatc taatggtcag cccgagaaca attacaagac cacaccccct 900
gtcctggact ccgatggcag cttctttctg tattcaaagc tgacagtgga taaatcccgc 960
tggcagcagg gaaacgtctt ctctgtagc gtgatgcatg aggtctctgca caatcattac 1020
actcagaagt ctctgagtct gtcaccaggg aaaggatcc 1059

```

<210> 316

15 <211> 1059

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> ADN que codifica la proteína de fusión TSG-6-LM-Fc

<400> 316

```

gctagcatgg acatgcgcgt acctgctcag ttgttggggc tcttgctgct gtggttgccc 60
ggggcacgtg gggcagatat cgccggtgtg taccacagag aagcacggtc tggcaaatac 120
aagctcacct acgcagaagc taaggcggtg tgtgaatttg aaggcggcc tctcgcaact 180
tacaagcagc tagaggcagc cagaaaaatt ggatttcattg tctgtgctgc tggatggatg 240
gctaaggcca gagttggata cccattgtg aagccagggc ccaactgtgg atttggaaaa 300
actggcatta ttgattatgg aatccgtctc aataggagtg aaagatggga tgcctattgc 360
tacaacaccg gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 420
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 480
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 540
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 600
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 660
aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 720
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgagg 780
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tccagcgac 840
atcgccgtgg agtgggagc caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 900
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 960
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcacg aggtctctga caaccactac 1020
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggatcc 1059

```

<210> 317
 <211> 1659
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> ADNc de HAS2
 10 <400> 317

```

atgcattgtg agaggtttct atgtatcctg agaataattg gaaccacact ctttggagtc 60
tctctcctcc ttggaatcac agctgcttat attgttggct accagtttat ccaaaccgat 120
aattactatt tctcttttgg actgtatggt gccttttttg catcacacct catcatccaa 180
agcctgtttg ccttttttga gcaccgaaaa atgaaaaaat ccctagaaac ccccataaag 240
ttgaacaaaa cagttgccct ttgcatcgct gcctatcaag aagatccaga ctacttaagg 300
aaatgtttgc aatctgtgaa aaggctaacc taccctggga ttaaagttgt catggtcata 360
gatgggaact cagaagatga cctttacatg atggacatct tcagtgaagt catgggcaga 420
gacaaatcag ccacttatat ctggaagaac aacttccacg aaaagggtcc cgggtgagaca 480
gatgagtcac ataaagaaag ctgcacaacac gtaacgcaat tggctttgtc caacaaaagt 540
atctgcatca tgcaaaaatg ggttgaaaaa agagaagtca tgtacacagc cttcagagca 600
ctgggacgaa gtgtggatta tgtacagggt tgtgattcag aactatgct tgaccagacc 660
tcatctgtgg agatggtaaa agttttagaa gaagatccca tggttggagg tgttggggga 720
gatgtccaga ttttaaaaa gtacgattcc tggatctcat tcctcagcag tgtaagatat 780
tggatggctt ttaatataga aagggcctgt cagtcctatt ttgggtgtgt tcagtgcatt 840
agtggacctc tgggaatgta cagaaactcc ttgttgcatg agtttgtgga agatttggtac 900
aatcaagaat ttatgggcaa ccaatgtagc tttgggtgat acaggcatct cacgaaccgg 960
gtgctgagcc tgggctatgc aacaaaatac acagctcgat ctaagtgcct tactgaaaca 1020
cctatagaat atctcagatg gctaaaccag cagaccggtt ggagcaagtc ctacttccga 1080
gaatggctgt acaatgcaat gtggtttcac aaacatcact tgtggatgac ctacgaagcg 1140
attatcactg gattctttcc tttctttctc attgccacag taatccagct cttctaccgg 1200
ggtaaaattt ggaacattct cctcttcttg ttaactgtcc agctagtagg tctcataaaa 1260
tcatcttttg ccagctgcct tagaggaaat atcgtcatgg tcttcatgtc tctctactca 1320
gtgttatata tgtcgagttt acttcccgc aagatgtttg caattgcaac aataaaaaaa 1380
gctgggtggg gcacatcagg aaggaaaacc attgtgttta atttcatagg actcattcca 1440
gtatcagttt ggtttacaat cctcctgggt ggtgtgattt tcaccattta taaggagtct 1500
aaaaggccat tttcagaatc caaacagaca gttctaattg ttggaacgtt gctctatgca 1560
tgctatttgg tcatgctttt gacgctgtat gtagttctca tcaataagtg tggcaggcgg 1620
aagaagggac aacaatatga catggtgctt gatgtatga 1659

```

<210> 318
 15 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> cadena pesada del anticuerpo anti-PD-LI

<400> 318

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

<210> 319
<211> 213
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> cadena ligera del anticuerpo anti-PD-L1

<400> 319

```

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

```

<210> 320

<211> 434

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada del anticuerpo anti-PD-L1

10

<400> 320

```

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

```

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

REIVINDICACIONES

1. Una combinación, que comprende:

una primera composición que comprende una hialuronidasa, en donde la hialuronidasa se conjuga con un polímero o se formula para la liberación lenta o se codifica en un vector para su suministro en un tumor; y una segunda composición que comprende un inhibidor de puntos de control inmunitario, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo anti-CTLA4, anti-PD-1 o anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

2. La combinación de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento del cáncer en un animal en donde el animal se expone primero a la hialuronidasa y a continuación se pone en contacto con el inhibidor de puntos de control inmunitario.

3. Un inhibidor de puntos de control inmunitario para su utilización en el tratamiento de un cáncer en un sujeto, en donde:

el sujeto ha sido tratado con una hialuronidasa; la hialuronidasa se conjuga con un polímero o se formula para la liberación sostenida, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo anti-CTLA4, anti-PD-1 o anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

4. La combinación de la reivindicación 1, combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o inhibidor de puntos de control inmunitario para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la hialuronidasa es una PH20 o una forma truncada de la misma que carece de un sitio de unión a glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal o una porción del sitio de unión a GPI, por lo que la PH20 es soluble.

5. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de la reivindicación 4, en donde:

la hialuronidasa es una PH20 truncada C-terminal seleccionada entre:

- a) una secuencia de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 217 que contiene los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 217 y residuos hasta un residuo de aminoácido C-terminal, por lo que el polipéptido está truncado en el extremo C de manera que no incluye la longitud completa del polipéptido cuya secuencia se expone como los aminoácidos 1-509 o 36-509 de SEQ ID NO: 217; y
- b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de a) que es soluble y conserva la actividad hialuronidasa.

6. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de la reivindicación 4, en donde la PH20 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 85% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 123-158 y conserva la actividad hialuronidasa.

7. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de las reivindicaciones 1-6, en donde el polímero es un polialquilenglicol, dextrano, pululano o celulosa.

8. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de la reivindicación 7, en donde el polialquilenglicol se selecciona entre polietilenglicol (PEG) o metoxipolietilenglicol (mPEG).

9. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde:

la composición de la enzima de degradación de hialuronano contiene entre 0,1 µg/mL y 100 µg/mL, de 1 µg/mL a 50 µg/mL o de 1 µg/mL a 20 µg/mL de enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero; o la composición de la enzima de degradación de hialuronano contiene entre 10 U/mL y 5.000 U/mL, de 50 U/mL a 4.000 U/mL, de 100 U/mL a 2.000 U/mL, de 300 U/mL a 2.000 U/mL, de 600 U/mL a 2.000 U/mL, o de 100 U/mL a 1.000 U/mL de enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero.

10. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitario es un fragmento de unión a antígeno.

11. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de las reivindicaciones 1-10, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

5 12. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de las reivindicaciones 1-10, en donde el anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario es un anticuerpo anti-CTLA4, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, seleccionado entre:

10 a) Ipilimumab, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
un dominio variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
NO: 22 y un dominio variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en
SEQ ID NO: 24; o
una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de
secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o
15 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera variable que consiste en una
secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%,
90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 24; y
b) Tremelimumab, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
un dominio variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
20 NO: 34 y un dominio variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en
SEQ ID NO: 36; y
una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de
secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o
25 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera variable que consiste en una
secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%,
90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 36.

30 13. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de las reivindicaciones 1-9, en donde el anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario es un anticuerpo anti-PD-1, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, seleccionado entre:

a) Nivolumab, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
un dominio variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
35 NO: 54 y un dominio variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en
SEQ ID NO: 56; o
una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de
secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o
99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 54 y una cadena ligera variable que consiste en una
secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%,
40 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 56;
b) MK-3475, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
un dominio variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
NO: 68 y un dominio variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en
SEQ ID NO: 70; o
45 una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de
secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o
99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 68 y una cadena ligera variable que consiste en una
secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%,
90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 70; y
50 c) Pidilizumab, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
un dominio variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
NO: 82 y un dominio variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en
SEQ ID NO: 84; o
55 una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de
secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o
99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 82 y una cadena ligera variable que consiste en una
secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%,
90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 84.

60 14. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de las reivindicaciones 1-9, en donde el anticuerpo anti-proteína de puntos de control inmunitario es un anticuerpo anti-PD-L1, un derivado del mismo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, seleccionado entre:

a) BMS-936559, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

un dominio variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 92 y un dominio variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 94; o

una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 92 y una cadena ligera variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 94;

b) MEDI4736, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

un dominio variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 102 y un dominio variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 104; o

una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 102 y una cadena ligera variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 104; y

c) MPDL3280A, un derivado del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

un dominio variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 114 y un dominio variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 115; o

una cadena pesada variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o 99% con la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 114 y una cadena ligera variable que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 115.

15. La combinación o combinación para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende adicionalmente un glucocorticoide.

16. La combinación o combinación para el uso de la reivindicación 15, en donde el glucocorticoide se selecciona entre cortisonas, dexametasonas, hidrocortisonas, metilprednisolonas, prednisolonas y prednisonas.

17. La combinación o combinación para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la hialuronidasa y el inhibidor de puntos de control inmunitario se formulan para la administración por la misma vía de administración o una vía de administración diferente.

18. La combinación o combinación para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la hialuronidasa y el inhibidor de puntos de control inmunitario están formulados para la administración sistémica.

19. La combinación o combinación para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la hialuronidasa y el inhibidor de puntos de control inmunitario están formulados para la administración intravenosa.

20. La combinación o combinación para el uso de las reivindicaciones 1-19, en donde la hialuronidasa se expone al animal hasta 48 horas antes de que el inhibidor de puntos de control inmunitario se exponga al animal.

21. La combinación, combinación para su uso o inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de las reivindicaciones 1-20, en donde el cáncer es un tumor y el tumor es un tumor sólido.

22. La combinación, combinación para su uso o el inhibidor de puntos de control inmunitario para el uso de la reivindicación 21, en donde el cáncer se selecciona entre cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, mesotelioma, CPCNP y cáncer de colon.