(11) Número de Publicação: **PT 2163643 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 9/26 (2015.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2004.03.05**

(30) Prioridade(s): **2003.03.05 US 452360 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.03.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.01.21**
095/2015

(73) Titular(es):
HALOZYME, INC.
11388 SORRENTO VALLEY ROAD SAN DIEGO, CA 92121 US

(72) Inventor(es):
LOUIS H. BOOKBINDER US
ANIRBAN KINDU US
GREGORY L. FROST US

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **GLICOPROTEÍNA HIALURONIDASE SOLÚVEL (SHASEGP), PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DA MESMA, SUAS UTILIZAÇÕES E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE A COMPREENDEM**

(57) Resumo:
O INVENTO REFERE-SE À IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS GLICOPROTEÍNAS HIALURONIDASE ACTIVAS SOLÚVEIS (SHASEGP), MÉTODOS DE FABRICAÇÃO, E SUA UTILIZAÇÃO PARA FACILITAR A ADMINISTRAÇÃO DE OUTRAS MOLÉCULAS OU PARA ALIVIAR PATOLOGIAS ASSOCIADAS A GLICOSAMINOGLICANO. DESCREVEM-SE DOMÍNIOS POLIPEPTÍDICOS MINIMAMENTE ACTIVOS DOS DOMÍNIOS DE SHASEGP ACTIVA EM MEIO NEUTRO, SOLÚVEL, QUE INCLUEM PORÇÕES AÇÚCAR LIGADAS A ASPARAGINA REQUERIDAS PARA UM DOMÍNIO DE HIALURONIDASE ACTIVO EM MEIO NEUTRO FUNCIONAL. INCLUEM-SE PÉPTIDOS DE COMANDO AMINO-TERMINAIS MODIFICADOS QUE MELHORAM A SECREÇÃO DE SHASEGP. O INVENTO COMPREENDE ADICIONALMENTE FORMAS SIALADAS E PEGUILADAS DE UMA SHASEGP RECOMBINANTE PARA MELHORAR A ESTABILIDADE E A FARMACOCINÉTICA NO SORO EM RELAÇÃO A ENZIMAS DE MATADOURO DE OCORRÊNCIA NATURAL. SÃO AINDA DESCRITAS FORMULAÇÕES ADEQUADAS DE UMA GLICOPROTEÍNA SHASEGP RECOMBINANTE SUBSTANCIALMENTE PURIFICADA OBTIDA A PARTIR DE UMA CÉLULA EUCARIOTA QUE GERA A GLICOSILAÇÃO APROPRIADA REQUERIDA PARA A SUA ACTIVIDADE ÓPTICA.

RESUMO

"Glicoproteína hialuronidase solúvel (sHASEGP), processo para preparação da mesma, suas utilizações e composições farmacêuticas que a compreendem"

O invento refere-se à identificação de novas glicoproteínas hialuronidase activas solúveis (sHASEGP), métodos de fabricação, e sua utilização para facilitar a administração de outras moléculas ou para aliviar patologias associadas a glicosaminoglicano. Descrevem-se domínios polipeptídicos minimamente activos dos domínios de sHASEGP activa em meio neutro, solúvel, que incluem porções açúcar ligadas a asparagina requeridas para um domínio de hialuronidase activo em meio neutro funcional. Incluem-se péptidos de comando amino-terminais modificados que melhoram a secreção de sHASEGP. O invento compreende adicionalmente formas sialadas e peguiladas de uma sHASEGP recombinante para melhorar a estabilidade e a farmacocinética no soro em relação a enzimas de matadouro de ocorrência natural. São ainda descritas formulações adequadas de uma glicoproteína sHASEGP recombinante substancialmente purificada obtida a partir de uma célula eucariota que gera a glicosilação apropriada requerida para a sua actividade óptica.

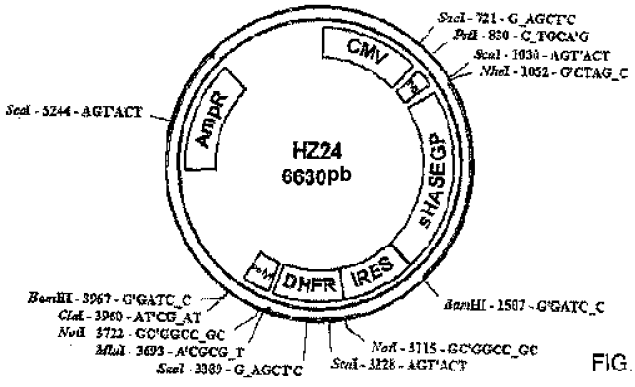

FIG. 1

DESCRIÇÃO

"Glicoproteína hialuronidase solúvel (sHASEGP), processo para preparação da mesma, suas utilizações e composições farmacêuticas que a compreendem"

ANTECEDENTES DO INVENTO

CAMPO DO INVENTO

O presente invento está especificado nas reivindicações e refere-se genericamente a Glicoproteínas Hialuronidase Solúveis Activas em Meio Neutro (sHASEGP), suas porções, particularmente domínios hialuronidase. O fascículo descreve modificações químicas, composições farmacêuticas, plasmídeos de expressão, métodos para fabricação e métodos terapêuticos utilizando as glicoproteínas hialuronidase e seus domínios e as moléculas de ácido nucleico de codificação para a modificação terapêutica de glicosaminoglicanos no tratamento de doenças e para utilização no aumento da difusão de outras moléculas injectadas com menos de 200 nanómetros de diâmetro num animal.

INFORMAÇÃO SOBRE ANTERIORIDADE

Os glicosaminoglicanos (GAG) são polissacáridos lineares complexos da matriz extracelular (ECM). Os GAG são caracterizados por estruturas dissacarídicas repetidas de uma hexosamina N-substituída e de um ácido urónico, [hialuronano (HA), sulfato de condroitina (CS), condroitina (C), sulfato de dermatano (DS), sulfato de heparano (HS), heparina (H)], ou uma galactose [sulfato de queratano (KS)]. Excepto o HA, todos existem ligados covalentemente a proteínas do núcleo. Os GAG com as suas proteínas de núcleo são estruturalmente referidos como proteoglicanos (PG).

O hialuronano (HA) é encontrado em mamíferos, predominantemente em tecidos conjuntivos, pele, cartilagem e em fluido sinovial. O hialuronano é também o principal constituinte do vítreo do olho. Em tecido conjuntivo, a água de hidratação associada com hialuronano cria espaços entre tecidos, criando assim um ambiente conducente ao movimento e à proliferação

celulares. O hialuronano desempenha um papel chave em fenómenos biológicos associados com a motilidade celular incluindo desenvolvimento rápido, regeneração, reparação, embriogénese, desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, angiogénese e tumorigénese (Toole 1991 Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, New York, 1384-1386; Bertrand *et al.* 1992 Int. J. Cancer 52:1-6; Knudson *et al.* 1993 FASEB J. 7:1233-1241). Adicionalmente, os níveis de hialuronano estão correlacionados com a agressividade do tumor (Ozello *et al.* 1960 Cancer Res. 20:600-604; Takeuchi *et al.* 1976, Cancer Res. 36:2133-2139; Kimata *et al.* 1983 Cancer Res. 43:1347-1354).

O HA é encontrado na matriz extracelular de muitas células, especialmente em tecidos conjuntivos moles. Têm sido atribuídas ao HA várias funções fisiológicas, tais como em homeostase de água e de proteínas de plasma (Laurent T.C. *et al.* (1992) FASEB J. 6: 2397-2404). A produção de HA aumenta em células proliferantes e pode desempenhar um papel na mitose. Tem também sido implicado na locomoção e migração celular. O HA parece desempenhar papéis importantes na regulação, desenvolvimento e diferenciação celulares (Laurent *et al.*, *supra*).

O HA tem sido utilizado em medicina clínica. As suas propriedades reológicas e protectoras de tecido têm provado ser úteis em cirurgia oftálmica para proteger o endotélio corneano durante a cirurgia das cataratas. HA no soro é diagnóstico de doença hepática e de várias condições inflamatórias, tais como artrite reumatóide. O edema intersticial causado por acumulação de HA pode causar disfunção em vários órgãos (Laurent *et al.*, *supra*).

Interacções hialuronano-proteína estão também envolvidas na estrutura da matriz extracelular ou "substância intercelular".

As hialuronidases são um grupo de enzimas activas em meio neutro e ácido encontradas através do reino animal. As hialuronidases variam no que se refere à especificidade por substrato e mecanismo de acção.

Existem três classes gerais de hialuronidases:

1. Hialuronidases do tipo mamífero (EC 3.2.1.35) que são endo-beta-N-acetil-hexosaminidases com tetrassacáridos e hexassacáridos como os principais produtos finais. Possuem actividades tanto hidrolítica como de transglicosidase, e podem degradar hialuronano e sulfatos de condroitina (CS), especificamente C4-S e C6-S.

2. Hialuronidases bacterianas (EC 4.2.99.1) degradam hialuronano e, em várias extensões, CS e DS. São endo-beta-N-acetil-hexosaminidases que operam por uma reacção de eliminação beta que produz principalmente produtos finais de dissacárido.

3. Hialuronidases (EC 3.2.1.36) de sanguessugas, outros parasitas e crustáceos são endo-beta-glucuronidases que geram produtos de tetrassacárido e hexassacárido através de hidrólise do sistema de ligação 1-3 beta.

As hialuronidases de mamífero podem ser adicionalmente divididas em dois grupos: enzimas activas em meio neutro e activas em meio ácido. Existem seis genes tipo hialuronidase no genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 e PH20/SPAM1. A HYALP1 é um pseudogene, e a HYAL3 não mostrou possuir actividade enzimática em relação a quaisquer substratos conhecidos. A HYAL4 é uma condroitinase e não possui actividade em relação a hialuronano. A HYAL1 é o protótipo de enzima activa em meio ácido e a PH20 é o protótipo de enzima activa em meio neutro. As hialuronidases activas em meio ácido, tais como HYAL1 e HYAL2, não têm actividade catalítica a pH neutro. Por exemplo, a HYAL1 não tem qualquer actividade catalítica *in vitro* acima de pH 4,5 (Frost *et al.* Anal. Biochemistry, 1997). A HYAL2 é uma enzima activa em meio ácido com uma actividade específica *in vitro* muito baixa.

As enzimas do tipo hialuronidase podem também ser caracterizadas por aquelas que estão fixadas à membrana plasmática através de uma âncora de glicosilfosfatidil-inositol, tais como a HYAL2 humana e a PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 15 Abr 2003; 100(8):4580-5, Phelps *et al.*, Science 1988) e por aquelas que são solúveis, tais como a HYAL1 humana (Frost *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 9 Jul 1997; 236(1):10-5). Contudo, existem variações de espécie para espécie: a PH20 de

bovino, por exemplo, está ligada de modo muito solto à membrana plasmática e não está ancorada através de uma âncora sensível a fosfolipase (Lalancette *et al.*, Biol. Reprod. Ago 2001; 65(2):628-36.). Esta particularidade única da hialuronidase bovina tem permitido a utilização da enzima hialuronidase de testículo de bovino solúvel como um extracto para utilização clínica (Wydase®, Hyalase®). PH20 de outras espécies são enzimas ancoradas a lípido que não são insolúveis sem a utilização de detergentes ou lipases. Por exemplo, a PH20 humana está ancorada à membrana plasmática através de uma âncora de GPI. Tentativas para produzir construções de ADN de PH20 humana, que não introduzissem uma âncora de lípido no polipéptido resultaram quer numa enzima cataliticamente inactiva, quer numa enzima insolúvel (Arming *et al.* Eur. J. Biochem. 1 Ago 1997; 247(3):810-4). Hialuronidase de esperma de macaco de ocorrência natural é encontrada numa forma tanto solúvel como ligada a membrana. Embora a forma ligada a membrana de 64 kDa possua actividade enzimática a pH 7,0, a forma de 54 kDa apenas é activa a pH 4,0 (Cherr *et al.*, Dev. Biol. 10 Abr 1996; 175(1):142-53.). Assim, formas solúveis de PH20 não possuem muitas vezes actividade enzimática sob condições neutras.

Gmachl *et al.*, FEBS 336(3): 545-548 (1993) descrevem a expressão recombinante da proteína do esperma humano PH-20. Lin *et al.*, JCB 125:1157-1163 (1994), descrevem a expressão recombinante de uma proteína de fusão PH-20-KT3 de ratinho e de cinomolgo.

As condroitinases são enzimas encontradas em todo o reino animal. Estas enzimas degradam glicosaminoglicanos através de uma reacção de endoglicosidase. Exemplos específicos de condroitinases conhecidas incluem Condroitinase ABC (derivada de *Proteus vulgaris*; Pedido de Patente Japonesa disponível ao público N.º 6-153947, T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi e S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968), S. Suzuki, H. Saito, T. Yamagata, K. Anno, N. Seno, Y. Kawai e T. Furuhashi, J. Biol. Chem., 243, 1543 (1968)), Condroitinase AC (derivada de *Flavobacterium heparinum*; T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi e S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968)), Condroitinase AC II (derivada de *Arthrobacter aurescens*; K. Hiyama e S. Okada, J. Biol. Chem., 250, 1824 (1975), K. Hiyama e S. Okada, J. Biochem. (Tokyo), 80, 1201 (1976)), hialuronidase ACIII

(derivada de *Flavobacterium* esp. Hp102; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Keiichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa, e Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989)), Condroitinase B (derivada de *Flavobacterium heparinum*; Y.M. Michelacci e C.P. Dietrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 973 (1974), Y.M. Michelacci e C.P. Dietrich, Biochem. J., 151, 121 (1975), Kenichi Maeyama, Akira Tawada, Akiko Ueno e Keiichi Yoshida, Seikagaku, 57, 1189 (1985)), Condroitinase C (derivada de *Flavobacterium* esp. Hp102; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Kelichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa e Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1939)), e outras.

As glicoproteínas são compostas de uma cadeia polipeptídica ligada covalentemente a uma ou mais porções carboidrato. Existem duas grandes categorias de glicoproteínas que possuem carboidratos acoplados através de um sistema de ligação quer N-glicosídico quer O-glicosídico à sua proteína constituinte. Os glicanos ligados a N e a O estão ligados a polipéptidos através de sistemas de ligação asparagina-N-acetil-D-glucosamina e serina(treonina)-N-acetil-D-galactosamina, respectivamente. Os oligossacáridos complexos ligados a N não contêm resíduos manose terminais. Contêm apenas resíduos terminais N-acetilglucosamina, galactose e/ou ácido siálico. Oligossacáridos híbridos contêm resíduos terminais manose bem como resíduos N-acetilglucosamina, galactose e/ou ácido siálico.

Com glicoproteínas ligadas a N, um precursor de oligossacárido é ligado ao grupo amino da asparagina durante a síntese peptídica no retículo endoplasmático. A porção oligossacárido é depois processada sequencialmente por uma série de enzimas específicas que eliminam e adicionam porções açúcar. O processamento ocorre no retículo endoplasmático e continua com passagem através do complexo cis-, medial- e trans-Golgi.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona um polipéptido de hialuronidase substancialmente purificado, em que:

o polipéptido contém pelo menos uma porção açúcar que está ligada covalentemente a um resíduo de asparagina (N) do polipéptido;

o polipéptido é activo em meio neutro;

o polipéptido consiste numa sequência de aminoácidos que possui pelo menos 98% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos representada pelos aminoácidos 1-448 de SEQ ID NO: 4; e

o polipéptido é solúvel. Aspectos adicionais do invento são definidos nas reivindicações.

São aqui divulgados membros da família da glicoproteína hialuronidase activa em meio neutro, solúvel, particularmente as glicoproteínas hialuronidase PH-20 solúveis humanas (também aqui referidas como sHASEGP). A sHASEGP aqui divulgada é um membro da família sHASEGP, aqui designada como uma sHASEGP. São também divulgados o domínio de hialuronidase solúvel, e suas utilizações.

O invento é baseado na constatação de que uma actividade de hialuronidase activa em meio neutro, solúvel, pode ser produzida com um elevado rendimento num sistema de expressão de mamífero por introdução de ácidos nucleicos que carecem de uma região estreita codificando aminoácidos no terminal carboxi do ADNc de PH20 humana. São também proporcionadas modificações adicionais da sHASEGP para melhorar a secreção pela utilização de péptidos de comando não nativos. São ainda proporcionados métodos para modificar a sHASEGP para prolongar a sua meia-vida mascarando a proteína com polietilenoglicol e modificações pós-tradução na glicosilação nativa. Tentativas anteriores para gerar uma sHASEGP humana activa em meio neutro segregada não foram bem sucedidas. Concluiu-se que truncagens do polipéptido de sHASEGP humana resultaram não só numa perda de actividade enzimática em meio neutro, mas também numa incapacidade das células para segregarem a proteína recombinante em sistemas de expressão de mamífero (Arming, *et al.* Eur. J. Biochem. 1 Ago 1997;247 (3):810-4). É crítico gerar sHASEGP segregada actuando em meio neutro para a produção comercial e utilização terapêutica como uma hialuronidase. O invento, aqui divulgado, ultrapassa estes desafios.

É também divulgada uma glicoproteína sHASEGP humana cataliticamente activa, em que a sHASEGP possui pelo menos uma porção açúcar ligada a N. Os estudos aqui apresentados demonstram que a PH20 humana requer glicanos ligados a N para a actividade catalítica, enquanto hialuronidases bovina e de veneno de abelha permanecem activas sem estes glicanos ligados a N. Um domínio de hialuronidase humana desprovido de porções ligadas a N é cataliticamente inactivo. Assim, a tecnologia de ADN recombinante clássica não permite a produção de uma sHASEGP humana cataliticamente activa, ao contrário da HASEGP de veneno de abelha que pode ser produzida em *E. coli*.

O invento inclui métodos e células para geração de um polipéptido de glicoproteína sHASEGP ligada a N como definido nas reivindicações, utilizando uma célula capaz de introduzir as referidas porções açúcar ligadas a N ou por introdução das referidas porções ligadas a N num polipéptido de sHASEGP. São ainda divulgados métodos para identificação de sHASEGP correctamente glicosiladas.

São também divulgadas glicoproteínas sHASEGP Super-Sialadas cataliticamente activas. As sHASEGP super-sialadas possuem maiores meias-vidas séricas comparativamente com as sHASEGP de testículos bovinos e ovinos não sialadas de ocorrência natural, e são portanto preferíveis tanto para estabilidade enzimática como para utilização como fármacos intravenosos. O invento proporciona métodos para a preparação de sHASEGP Super-Sialadas, suas composições e utilizações.

São igualmente divulgadas proteínas codificadas por variantes de *splicing* de sHASEGP naturalmente deficientes âncora de em GPI.

São ainda divulgadas composições da sHASEGP compreendendo, uma glicoproteína sHASEGP solúvel com um ião metálico, em que o ião metálico é Cálcio, Magnésio ou Sódio. As sHASEGP são optimamente activas na presença dos referidos metais. São também divulgadas formulações consistindo em sHASEGP na presença dos referidos iões metálicos.

São proporcionadas modificações de sHASEGP para prolongar adicionalmente a meia-vida. São proporcionadas modificações

químicas de uma sHASEGP com polímeros tais como polietilenoglicol e dextrano. Estas modificações protegem as sHASEGP de serem removidas da circulação e do sistema imunitário bem como receptores de glicosilação para manose e uma sialoglicoproteína. São ainda proporcionados métodos para ligação a grupos funcionais específicos tais como locais de glicosilação, aminoácidos carregados positivamente e cisteínas.

São também aqui proporcionados ensaios para identificação de efectores, tais como compostos, incluindo moléculas pequenas, e condições, tais como pH, temperatura e força iónica, que modulam a activação, expressão ou actividade de sHASEGP. Em ensaios exemplares, são avaliados os efeitos de compostos de teste na capacidade de um domínio de hialuronidase de sHASEGP para clivar um substrato conhecido, tipicamente um glicosaminoglicano ou proteoglicano. Agentes, geralmente compostos, particularmente moléculas pequenas, que modulam a actividade do domínio de hialuronidase são compostos candidatos para modulação da actividade da sHASEGP. Os domínios de hialuronidase podem também ser utilizados para produzir anticorpos específicos de hialuronidase com actividade perturbadora da função. Os domínios de hialuronidase aqui proporcionados incluem, mas não estão limitados a, o domínio de glicosil-hidrolase N-terminal com suas porções truncadas C-terminais que exibem actividade catalítica *in vitro*.

São também proporcionadas moléculas de ácido nucleico codificando proteínas e domínios de hialuronidase. São proporcionadas moléculas de ácido nucleico que codificam um domínio de hialuronidase solúvel ou suas porções cataliticamente activas e também aquelas que codificam a sHASEGP a todo o comprimento. Ácido nucleico codificando o domínio de hialuronidase e ácido nucleico a jusante é apresentado na SEQ ID NO:6; e o domínio de hialuronidase de sHASEGP é apresentado na SEQ ID NO:1 (aminoácidos 35-464). A sequência de proteína e a sequência de ácido nucleico de codificação da sHASEGP a todo o comprimento são apresentadas nas SEQ ID NO:1 e 6.

São também proporcionadas moléculas de ácido nucleico que hibridam com este ácido nucleico codificando sHASEGP ao longo de todo o seu comprimento ou ao longo de pelo menos cerca de 70%, 80% ou 90% de todo o comprimento e codificam o domínio de

hialuronidase ou sua porção. A hibridação é geralmente efectuada sob condições de rigor pelo menos baixo, geralmente pelo menos moderado e frequentemente elevado.

O fragmento de ácido nucleico isolado é ADN, incluindo ADN genómico ou ADNc, ou é ARN, ou podem incluir outros componentes, tais como proteína-ácido nucleico ou outros análogos de nucleótidos. O ácido nucleico isolado pode incluir componentes adicionais, tais como promotores heterólogos ou nativos, e outras sequências reguladoras de transcrição e tradução, estes genes podem estar ligados a outros genes, tais como genes repórter ou outros genes indicadores ou genes que codificam indicadores.

É também proporcionada uma molécula de ácido nucleico isolada que inclui a sequência de moléculas que é complementar com a sequência de nucleótidos codificando sHASEGP ou a sua porção.

São também proporcionados seus fragmentos ou oligonucleótidos que podem ser utilizados como sondas ou iniciadores e que contêm pelo menos cerca de 10, 14, 16 nucleótidos, geralmente menos de 1000 ou menos de ou um número igual a 100, apresentados na SEQ ID NO:6 (ou o seu complemento); ou contêm pelo menos cerca de 30 nucleótidos (ou o seu complemento) ou contêm oligonucleótidos que hibridam ao longo de todo o seu comprimento (ou pelo menos cerca de 70, 80 ou 90% do seu comprimento) com quaisquer destes fragmentos ou oligonucleótidos. Os comprimentos dos fragmentos são uma função do propósito para o qual eles são utilizados e/ou da complexidade do genoma de interesse. Geralmente as sondas e iniciadores contêm menos do que cerca de 50, 150 ou 500 nucleótidos.

São também proporcionados plasmídeos contendo qualquer das moléculas de ácido nucleico aqui proporcionadas. São também proporcionadas células contendo os plasmídeos. Estas células incluem, mas não estão limitadas a, células bacterianas, células de levedura, células fúngicas, células de planta, células de insecto e células de animais.

São também proporcionados sistemas de expressão de mamífero melhorados utilizando comandos de sinal capazes de secreção eficiente de sHASEGP. Um exemplo de uma tal sequência de aminoácidos de péptido de comando secretor eficiente e de uma proteína de fusão com sHASEGP é encontrado nas SEQ ID NO:43 e 46.

É também proporcionado um método de produção de sHASEGP através do crescimento das células acima descritas sob condições nas quais a sHASEGP é expressa pelas células, e recuperação do polipéptido ou glicoproteína sHASEGP expressos. São também proporcionados métodos para o isolamento de ácido nucleico que codifica outras sHASEGP.

São também proporcionadas células, geralmente células eucariotas, tais como células de mamífero e células de levedura, nas quais um polipéptido de sHASEGP é expresso sobre a superfície das células. Estas células são utilizadas em ensaios de rastreio de fármacos para identificar compostos que modulam a actividade do polipéptido de sHASEGP. Estes ensaios incluem ensaios de ligação *in vitro*, e ensaios baseados na transcrição nos quais é avaliada a transdução de sinal mediada directamente ou indirectamente, tal como através da activação de pró-factores de crescimento, pela sHASEGP.

São também proporcionados péptidos codificados por estas moléculas de ácido nucleico. Incluído entre esses polipéptidos está o domínio de hialuronidase de sHASEGP ou um polipéptido com alterações de aminoácidos tais que a especificidade e/ou a actividade de hialuronidase permaneçam substancialmente inalteradas. Em particular, é proporcionada uma glicoproteína sHASEGP de mamífero substancialmente purificada que inclui uma glicoproteína cataliticamente activa em meio neutro segregada.

O invento também inclui um domínio catalítico de hialuronidase e pode incluir adicionalmente outros domínios. A sHASEGP pode formar homodímeros e pode também formar heterodímeros com alguma outra proteína, tal como uma proteína ligada a membrana. É também proporcionada uma glicoproteína substancialmente purificada incluindo uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% de identidade com a sHASEGP, onde a percentagem de identidade é determinada utilizando algoritmos padrão e penalidades para lacunas que maximizam a percentagem de identidade.

São aqui contempladas variantes de *splicing* da sHASEGP, particularmente aquelas com um domínio de hialuronidase cataliticamente activo.

Em outras concretizações, são proporcionados polipéptidos substancialmente purificados que incluem um domínio de hialuronidase de um polipéptido de sHASEGP ou uma sua porção cataliticamente activa, mas que não incluem a sequência completa de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:1. Entre eles estão polipéptidos que incluem uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência com SEQ NO:1 ou 3.

É proporcionado um ácido nucleico que codifica uma glicoproteína hialuronidase eucariota, designada sHASEGP. Em particular, o ácido nucleico inclui a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO:6, particularmente apresentada como os nucleótidos 106-1446 da SEQ ID NO:6, ou uma sua porção que codifica um polipéptido cataliticamente activo.

São também proporcionadas moléculas de ácido nucleico que hibridam sob condições de rigor pelo menos baixo, geralmente rigor moderado, mais tipicamente rigor elevado, com a SEQ ID NO:6 ou seus degenerados.

O fragmento de ácido nucleico isolado hibrida com uma molécula de ácido nucleico contendo a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO:6 (ou seus degenerados) sob condições de rigor elevado. Uma sHASEGP a todo o comprimento é apresentada na SEQ ID NO:1 e é codificada pela SEQ ID NO:6 ou seus degenerados.

São também proporcionadas muteínas do domínio de hialuronidase de sHASEGP, particularmente muteínas nas quais o resíduo Cys no domínio de hialuronidase que está livre (*i.e.*, não forma sistemas de ligação dissulfureto com qualquer outro resíduo Cys no domínio de hialuronidase) está substituído por

outra substituição de aminoácido, tipicamente, ainda que não necessariamente, por uma substituição de aminoácido conservativa ou por uma substituição que não elimina a actividade, e muteínas nas quais um local ou locais de glicosilação específica estão eliminados.

São aqui proporcionados polipéptidos de sHASEGP, incluindo, mas não limitados a, suas variantes de *splicing*, e ácidos nucleicos codificando sHASEGP, e seus domínios, derivados e análogos. São também proporcionadas glicoproteínas hialuronidase segregadas de cadeia simples que têm um terminal N funcionalmente equivalente ao gerado por activação de uma peptidase de sinal para formar sHASEGP. Existem sete locais de glicosilação potenciais ligados a N em N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de sHASEGP como exemplificado na SEQ ID NO:1. Formam-se ligações dissulfureto entre os resíduos Cys C60-C351 e os resíduos Cys C224 a C238 para formar o domínio central de hialuronidase. No entanto, são requeridas cisteínas adicionais no terminal carboxi para actividade catalítica da enzima em meio neutro tal que a sHASEGP dos aminoácidos 36 a Cys 464 na SEQ ID NO:1 constitui o domínio de hialuronidase de sHASEGP minimamente activo. Assim, o local de glicosilação ligado a N, N-490, não é requerido para uma actividade de sHASEGP apropriada.

A glicosilação ligada a N das sHASEGP é crítica para a sua actividade catalítica e estabilidade. Embora a alteração do tipo de glicano que modifica uma glicoproteína possa ter efeitos dramáticos na antigenicidade, dobragem estrutural, solubilidade e estabilidade de uma proteína, pensa-se que muitas enzimas não requerem glicosilação para uma actividade enzimática óptima. As sHASEGP são assim únicas em relação a este aspecto, uma vez que a remoção de glicosilação ligada a N pode resultar na inactivação quase completa da actividade de hialuronidase. A presença de glicanos ligados a N é crítica para gerar uma sHASEGP activa. São incluídos sistemas de expressão de proteína adequados para a introdução de resíduos críticos de glicosilação ligada a N na sHASEGP. Adicionalmente, é incluída a introdução de um polipéptido de sHASEGP desglicosilado na presença de extractos capazes de introduzirem glicanos ligados a N. Num aspecto do invento, é descrita a glicosilação complexa coberta com sialação ao mesmo tempo que são também contempladas outras

glicosilações cobertas com resíduos manose livres. Preferivelmente, são encontrados resíduos de ácido siálico nos resíduos terminais de glicosilação ligada a N na sHASEGP.

Os oligossacáridos ligados a N caem em vários tipos principais (oligomanose, complexo, híbrido, sulfatado), que possuem todos núcleos (Man)3-GlcNAc-GlcNAc- ligados através do azoto de amida de resíduos Asn que se situam dentro de sequências -Asn-Xaa-Thr/Ser- (onde Xaa não é Pro). A glicosilação num local -Asn-Xaa-Cys- tem sido noticiada para proteína C de coagulação. Locais ligados a N são muitas vezes atribuídos indirectamente pelo aparecimento de um ciclo em "branco" durante a sequenciação. A identificação positiva pode ser efectuada após libertação do oligossacárido por PNGase F, que converte a Asn glicosilada em Asp. Após libertação por PNGase F, os oligossacáridos ligados a N podem ser purificados utilizando cromatografia em Bio-Gel P-6, com as fracções combinadas de oligossacárido submetidas a cromatografia de permuta aniónica a pH elevado (HPAEC) preparativa (Townsend *et al.*, (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). Certos isómeros de oligossacárido podem ser resolvidos utilizando HPAEC. Resíduos fucose desviarão as posições de eluição para mais cedo no cromatograma de HPAEC, enquanto resíduos ácido siálico adicionais aumentarão o tempo de retenção. O tratamento concorrente de glicoproteínas cujas estruturas de oligossacárido são conhecidas (*e.g.*, fetuína de bovino, glicoproteína ácida a-1, ovalbumina, ARNase B, transferrina) pode facilitar a atribuição dos picos de oligossacárido. Os oligossacáridos recolhidos podem ser caracterizados por uma combinação de análises de composição e de ligações de metilação (Waeghe*et al.*, (1983) Carbohydr. Res. 123, 281-304.), com as configurações anoméricas atribuídas por espectroscopia de RMN (Van Halbeek (1993) em Methods Enzymol. 230).

São também proporcionadas formulações de sHASEGP. As sHASEGP podem ser formuladas em formas liofilizadas e soluções estabilizadas. Formulações contendo iões metálicos específicos, tais como cálcio, magnésio ou sódio, são úteis para actividade óptima a pH neutro. Para além de formulações em solução estabilizada, são aqui contempladas formulações de libertação retardada para remoção prolongada de glicosaminoglicanos. São também aqui proporcionados *kits* fornecendo seringas pré-cheias

de sHASEGP para a administração de pequenos volumes de sHASEGP para procedimentos cirúrgicos intra-oculares e outros procedimentos de pequeno volume. São também proporcionadas formulações salinas equilibradas para utilização ex *vivo* em procedimentos de tecnologia reprodutiva artificial.

São também proporcionados métodos para a utilização das sHASEGP na remoção de glicosaminoglicanos. As sHASEGP abrem canais no espaço intersticial através da degradação de glicosaminoglicanos o que permite a difusão de moléculas com uma dimensão inferior a 500 nm. Estes canais permanecem durante um período de 24-48 horas dependendo da dose e da formulação. Estes canais podem ser utilizados para facilitar a difusão de moléculas adicionadas exogenamente tais como fluidos, moléculas pequenas, proteínas, ácidos nucleicos e vectores de terapia génica e outras moléculas com uma dimensão inferior a 500 nm.

As sHASEGP podem também ser utilizadas para remover glicosaminoglicanos em excesso tais como aqueles que ocorrem após isquemia-reperfusão, inflamação, arterioesclerose, edema, cancro, lesão da medula espinal e outras formas de necrose. Nalguns casos, as sHASEGP podem ser entregues sistemicamente por perfusão intravenosa. Isto pode ser útil quando o acesso local não está facilmente disponível, tal como o coração ou o cérebro, ou no caso de um neoplasma disseminado onde a doença está espalhada pelo corpo. São preferíveis sHASEGP super-sialadas para aumentar a meia-vida e a distribuição no soro em relação às enzimas hialuronidase nativas que não possuem ácidos siálicos terminais.

Nalgumas circunstâncias, tais como lesão da medula espinal, glaucoma e tratamentos cosméticos, prefere-se a libertação controlada.

Noutras indicações, é preferível uma única dose de actuação curta. A remoção temporária de glicosaminoglicanos pode ser utilizada para melhorar a entrega de soluções e fármacos ao interior de espaços intersticiais. Isto pode ser útil para a difusão de anestesia e para a administração de fluidos terapêuticos, moléculas e proteínas. A administração subcutânea e intramuscular de moléculas na presença de sHASEGP facilita também a sua distribuição sistémica mais rapidamente. Estes

métodos são muito úteis quando o acesso intravenoso não está disponível ou quando é necessária uma entrega sistémica mais rápida de moléculas. A entrega de outras moléculas grandes tais como Factor VIII, que ficam fracamente biodisponíveis por administração subcutânea, pode ser injectada com sHASEGP para aumentar a sua disponibilidade.

São também proporcionadas utilizações de sHASEGP para remoção enzimática de matriz de *cumulus* rodeando os oócitos. A remoção da matriz de *cumulus* utilizando uma sHASEGP purificada sem os contaminantes tóxicos de hialuronidase derivada de extracto permite uma recuperação mais suave do oócito com maiores viabilidades. Para além disso, as sHASEGP podem ser fabricadas sem a utilização de extractos de gado ou outros organismos que transportam vírus e outros patogénios, tais como encefalopatias espongiformes transmissíveis.

As injecções de pequenos volumes de sHASEGP para utilização intra-ocular podem também ser utilizadas para pequenos espaços. As sHASEGP podem ser injectadas na câmara anterior do olho para remover substratos viscoelásticos em excesso que são administrados durante a cirurgia. A injecção intra-ocular de sHASEGP pode também ser utilizada para reduzir a pressão intra-ocular no glaucoma, para dissolver agregados vítreos, ou "floaters", para limpar hemorragias do vítreo, para o tratamento de degeneração macular, para promover descolamento vítreo-retiniano em retinopatia diabética e para serem misturadas com outras enzimas para promover reformatação da córnea em conjunto com lentes correctivas. Em alguns casos, é reconhecido que será desejável a utilização de uma sHASEGP de longa duração tal como uma sHASEGP peguilada.

Podem também ser concebidas co-formulações de sHASEGP com outras substâncias para canetas injectáveis para administração subcutânea rápida ou de pequeno volume. Podem ser formulados exemplos tais como Epipen®, insulina e outros fluidos. Os métodos do invento incluem administração do polipéptido de sHASEGP ou composições farmacêuticas contendo sHASEGP antes, em simultâneo ou após administração de outras moléculas terapêuticas. A sHASEGP pode ser administrada num local diferente do local de administração da molécula terapêutica ou

a sHASEGP pode ser administrada no mesmo local que o local de administração da molécula terapêutica.

Assim, é aqui proporcionada uma família de glicoproteínas hialuronidase activas em meio neutro, segregadas, eucariotas, designadas por sHASEGP, e seus domínios funcionais, especialmente domínios hialuronidase (ou catalíticos), muteínas e outros seus derivados e análogos. São também aqui proporcionados ácidos nucleicos codificado as sHASEGP. Adicionalmente, são proporcionadas formulações e utilizações terapêuticas das referidas sHASEGP para tratar doenças e para utilização como enzimas para modificação de tecido.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um mapa vectorial do vector de sHASEGP HZ24.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

A. DEFINIÇÕES

A não ser que definidos de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que é habitualmente entendido por um perito na especialidade à qual o(s) invento(s) pertence(m). Na eventualidade de existir aqui uma pluralidade de definições para os termos, prevalecerão os desta secção.

Onde é feita referência a uma URL, ou a um outro destes identificadores ou endereços, é entendido que estes identificadores podem alterar-se e que a informação particular na Internet pode surgir e desaparecer, mas que informação equivalente pode ser encontrada pesquisando a Internet. Estas referências evidenciam a disponibilidade e a disseminação pública desta informação.

Como aqui utilizadas, as abreviaturas para quaisquer grupos protectores, aminoácidos e outros compostos, a não ser que indicado de outro modo, estão de acordo com a sua utilização comum, com abreviaturas reconhecidas ou com a IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (ver, (1972) Biochem. 11: 942-944).

Como aqui utilizado, hialuronidase eucariota refere-se a uma família variada de glicosaminoglicano-endoglucosaminidases, onde um resíduo glutamato na hialuronidase hidrolisa os sistemas de ligação beta 1,4 de hialuronano e sulfatos de condroitina através de um mecanismo catalítico ácido-base.

São de interesse particular as sHASEGP de origem mamífera, incluindo humana. Os peritos nesta especialidade reconhecem que, em geral, substituições de aminoácidos individuais em regiões não essenciais de um polipéptido não alteram substancialmente a actividade biológica (ver, *e.g.*, Watson *et al.*, (1987) Molecular Biology of the Gene, 4.ª Edição, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224).

Como aqui utilizado, sHASEGP ancorada a membrana, refere-se a uma família de hialuronidases ancoradas a membrana que partilham características estruturais comuns como aqui descrito.

Como aqui utilizado, hialuronidase solúvel refere-se a um polipéptido caracterizado pela sua solubilidade sob condições fisiológicas. A HASEGP solúvel pode-se distinguir por exemplo pela sua partição na fase aquosa de uma solução de Triton X-114 aquecida a 37ºC (Bordier *et al.* J. Biol. Chem. 25 Fev 1981; 256 (4): 1604-7). A HASEGP ancorada a lípido, por outro lado, será repartida numa fase rica em detergente, mas será repartida numa fase pobre em detergente ou aquosa após tratamento com fosfolipase C.

Assim, por exemplo, a referência a "sHASEGP" abrange todas as glicoproteínas codificadas pela família de genes de sHASEGP, incluindo mas não limitadas a: sHASEGP humana, sHASEGP de ratinho ou uma molécula equivalente obtida a partir de qualquer outra fonte ou que tenha sido preparada sinteticamente ou que exiba a mesma actividade. Sequências de moléculas de ácido nucleico codificantes e as sequências de aminoácidos codificadas de sHASEGP exemplares e/ou seus domínios, são apresentadas, por exemplo na SEQ ID NO:4. O termo abrange também sHASEGP com substituições de aminoácidos que não alteram substancialmente a actividade de cada membro e abrange também suas variantes de *splicing*. Substituições adequadas, incluindo,

ainda que não necessariamente, substituições conservativas de aminoácidos, são conhecidas dos peritos nesta especialidade e podem ser efectuadas sem eliminação da actividade biológica, tal como a actividade catalítica, da molécula resultante.

Como aqui utilizado, sempre que aqui referenciada, uma sHASEGP inclui pelo menos um ou todos, ou qualquer combinação, de entre: um polipéptido codificado pela sequência de nucleótidos apresentada em SEQ ID NO:6 ou por uma sequência de nucleótidos que inclui nucleótidos que codificam os aminoácidos 1-509 de SEQ ID NO:1; um polipéptido codificado por uma sequência de nucleótidos que hibrida sob condições de rigor baixo, moderado ou elevado com a sequência de nucleótidos apresentada em SEQ ID NO:6; um polipéptido que inclui a sequência de aminoácidos representada pelos aminoácidos 1-509 de SEQ ID NO:1; um polipéptido que inclui uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos cerca de 60%, 70%, 75%, 80%, 81 %, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos representada em SEQ ID NO:1 ou pelos aminoácidos 1-448 de SEQ ID NO:4.

Em particular, é proporcionado o polipéptido de sHASEGP, com os domínios de hialuronidase como indicados em SEQ ID NO:4. O polipéptido é um polipéptido de cadeia simples ou dupla. São também proporcionadas suas porções mais pequenas que retêm actividade de hialuronidase. Os domínios de hialuronidase das sHASEGP variam em tamanho e constituição, incluindo inserções e deleções em laçadas de superfície. Assim, para os presentes propósitos, o domínio catalítico é uma porção de uma sHASEGP, como aqui definida, e é homólogo de um domínio de outras sequências do tipo hialuronidase, tais como HYAL1, HYAL2, HYAL3, que foram anteriormente identificadas; não foi reconhecido, porém, que uma forma de cadeia simples isolada do domínio de hialuronidase humana pudesse funcionar em ensaios *in vitro*. Os resíduos aspartato e glutamato necessários para actividade estão presentes em motivos conservados.

Como aqui utilizado, um "domínio de hialuronidase activo em meio neutro de uma sHASEGP solúvel" refere-se a um domínio de beta-1,4-endoglucosaminidase de uma sHASEGP que exibe actividade de hialuronidase a pH neutro, é solúvel sob condições

como descrito e partilha homologia e características estruturais com os domínios da família glicosil-hidrolase de hialuronidase mas contém sequências adicionais no terminal carboxi que são requeridas para actividade em meio neutro. Deste modo, é pelo menos a porção mínima do domínio que exibe actividade de hialuronidase como avaliada por ensaios padrão *in vitro* e permanece solúvel. São aqui contemplados esses domínios de hialuronidase e suas porções cataliticamente activas. São também proporcionados formas truncadas dos domínios de hialuronidase que incluem o seu fragmento mais pequeno que actua cataliticamente como uma forma de cadeia simples.

Um domínio de hialuronidase de uma sHASEGP, sempre que aqui referenciado, inclui pelo menos uma ou a totalidade de ou qualquer combinação de ou uma porção cataliticamente activa de: um polipéptido de glicoproteína ligada a N que inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:1; um polipéptido codificado por uma sequência de nucleótidos que hibrida, sob condições de rigor baixo, moderado ou elevado, com a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO:6; um polipéptido que inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:1; um polipéptido que inclui uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos representada em SEQ ID NO:1; e/ou um domínio de hialuronidase de um polipéptido codificado por uma variante de *splicing* da sHASEGP.

Assim, para os presentes propósitos, o domínio de hialuronidase é uma porção de uma sHASEGP, como aqui definida, e é homólogo de um domínio de outras sHASEGP. Tal como sucede com a classe de enzimas mais vasta da família de hialuronidase, os domínios catalíticos de sHASEGP partilham um elevado grau de identidade de sequência de aminoácidos. Os resíduos Asp e Glu necessários para actividade estão presentes em motivos conservados.

Por forma activa pretende-se significar uma forma activa *in vivo* e/ou *in vitro*. Como aqui descrito, o domínio de hialuronidase existe como uma glicoproteína segregada solúvel. É aqui mostrado que, pelo menos *in vitro*, as formas de cadeia

simples das sHASEGP e os seus domínios catalíticos ou porções enzimaticamente activas (tipicamente truncagens C-terminais) exibem actividade de hialuronidase. Deste modo, são aqui proporcionadas formas isoladas dos domínios de hialuronidase de sHASEGP e sua utilização em ensaios de rastreio de fármacos *in vitro* para identificação de agentes que modulam a sua actividade.

Como aqui utilizado, o domínio cataliticamente activo de uma sHASEGP refere-se ao domínio de endoglucosaminidase activo em meio neutro como definido pela actividade *in vitro* em relação a um substrato de glicosaminoglicano.

As sHASEGP de interesse incluem aquelas que são activas contra sulfatos de condroitina e proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) *in vivo* e *in vitro*; e aquelas que são activas contra hialuronano. Como aqui utilizado, uma sHASEGP humana é uma codificada por ácido nucleico, tal como ADN, presente no genoma de um humano, incluindo todas as variantes alélicas e variações conservativas desde que estas não sejam variantes encontradas noutros mamíferos.

Como aqui utilizado, "ácido nucleico codificando um domínio de hialuronidase ou porção cataliticamente activa de uma sHASEGP" deverá ser entendido como referindo-se a um ácido nucleico codificando apenas o domínio de hialuronidase de cadeia simples citado ou sua porção activa, e não as outras porções contíguas da sHASEGP como uma sequência contínua.

Como aqui utilizado, "doença" ou "distúrbio" refere-se a uma condição patológica num organismo resultante, *e.g.*, de uma infecção ou defeito genético, e caracterizada por sintomas identificáveis.

Como aqui utilizado, uma variante de *splicing* refere-se a uma variante produzida por processamento diferencial de um transcrito primário de ácido nucleico genómico, tal como ADN, que resulta em mais do que um tipo de ARNm. São aqui proporcionadas variantes de *splicing* de sHASEGP.

Como aqui utilizado, o domínio de hialuronidase de uma proteína sHASEGP refere-se ao domínio de hialuronidase de uma

sHASEGP que exibe actividade de endoglucosaminidase em meio neutro. Deste modo, é pelo menos a porção mínima da proteína que exibe actividade de endoglucosaminidase como avaliada por ensaios padrão *in vitro*. Os domínios de hialuronidase humana do invento incluem pelo menos uma porção de sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO:4 suficiente para exibir actividade de endoglucosaminidase.

São também contempladas moléculas de ácido nucleico que codificam um polipéptido que tem actividade de endoglucosaminidase num ensaio de hialuronidase *in vitro* e que possuem pelo menos 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com todo o comprimento de um domínio de hialuronidase de um polipéptido de sHASEGP, ou que hibridam ao longo de todo o seu comprimento ou ao longo de pelo menos cerca de 70%, 80% ou 90% de todo o comprimento com ácidos nucleicos que codificam um domínio de hialuronidase, particularmente sob condições de rigor moderado, geralmente elevado.

Para os domínios de hialuronidase, resíduos na região N-terminal podem ser críticos mas ainda assim não suficientes para a actividade. É aqui mostrado que o domínio de hialuronidase da sHASEGP é cataliticamente activo. Deste modo, o domínio de hialuronidase requer geralmente os seus aminoácidos N-terminais para actividade; a porção do terminal C pode ser truncada até ao último resíduo cisteína mas requer ainda aminoácidos adicionais para ser optimamente activa. A quantidade que pode ser removida pode ser determinada empiricamente testando o polipéptido quanto a actividade de hialuronidase num ensaio *in vitro* que avalia a clivagem catalítica.

Por conseguinte, são contempladas porções mais pequenas dos domínios de hialuronidase, particularmente os seus domínios de cadeia simples que retêm actividade de hialuronidase. Estas versões mais pequenas são geralmente versões truncadas no terminal C dos domínios de hialuronidase. Os domínios de hialuronidase variam em tamanho e constituição, incluindo inserções e deleções em laçadas de superfície. Estes domínios exibem estrutura conservada, incluindo pelo menos uma

particularidade estrutural, tal como o doador de protões, e/ou outras particularidades de domínios de hialuronidase de endoglucosaminidases. Assim, para os presentes propósitos, o domínio de hialuronidase é uma porção de cadeia simples de uma sHASEGP, como aqui definida, mas é homólogo nas suas características estruturais e de retenção de similaridade ou homologia de sequência, do domínio de hialuronidase de outras sequências do tipo hialuronidase. A glicoproteína exibe actividade de hialuronidase como uma cadeia simples.

Como aqui utilizado, por homólogo significa uma identidade de sequência de ácido nucleico superior a cerca de 25%, tal como 25%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95%. Se necessário, a percentagem de homologia será especificada. Os termos "homologia" e "identidade" são muitas vezes utilizados indiferenciavelmente. Em geral, as sequências são alinhadas de modo a obter o maior grau de correspondência (ver, *e.g.*: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., e Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; e Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; Carillo *et al.* (1988) SIAM J. Applied Math. 48: 1073).

Por identidade de sequência, os números de aminoácidos conservados são determinados por programas de algoritmos de alinhamento padrão, e são utilizados com penalidades de lacunas por defeito estabelecidas por cada fornecedor. Moléculas de ácido nucleico substancialmente homólogas hibridarão tipicamente a rigor moderado ou a rigor elevado ao longo de todo o comprimento do ácido nucleico ou ao longo de pelo menos cerca de 70%, 80% ou 90% da molécula de interesse de ácido nucleico a todo o comprimento. São também contempladas moléculas de ácido nucleico que contêm codões degenerados em vez de codões na molécula de ácido nucleico de hibridação.

Se quaisquer duas moléculas de ácido nucleico têm ou não sequências de nucleótidos que são pelo menos, por exemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% "idênticas" pode ser

determinado utilizando algoritmos de computador conhecidos tais como o programa "FASTA", utilizando, por exemplo, os parâmetros por defeito como em Pearson *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (outros programas incluem o pacote de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al.*, J. Molec. Biol. 215: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ED., Academic Press, San Diego, 1994, e Carillo *et al.*, (1988) SIAM J. Applied. Math. 48: 1073). Por exemplo, a função BLAST da National Center for Biotechnology Information Database pode ser utilizada para determinar a identidade. Outros programas disponíveis comercialmente ou disponíveis ao público incluem, DNASTAR "MEGALIGN" PROGRAM (Madison, WI) e o programa "Gap" do Genetics Computer Group da University of Wisconsin (UWG) (Madison WI). A percentagem de homologia ou identidade de proteínas e/ou moléculas de ácido nucleico pode ser determinada, por exemplo, por comparação da informação de sequência utilizando um programa de computador GAP (*e.g.* Needleman *et al.* (1970), J. Mol. Biol. 48: 443, como revisto por Smith e Waterman Adv. Appl. Math (1981) 2:482). Resumidamente, o programa GAP define similaridade como o número de símbolos alinhados (*i.e.*, nucleótidos ou aminoácidos) que são similares, dividido pelo número total de símbolos na mais curta das duas sequências. Parâmetros por defeito para o programa GAP podem incluir: (1) uma matriz de comparação unária (contendo um valor de 1 para identidades e 0 para não identidades) e a matriz de comparação ponderada de Gribskov *et al.* (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, como descrito por Schwartz e Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979); (2) uma penalidade de 3,0 para cada lacuna e uma penalidade adicional de 0,10 por cada símbolo em cada lacuna; e (3) nenhuma penalidade para lacunas nas extremidades. Deste modo, como aqui utilizado, o termo "identidade" representa uma comparação entre um polipéptido ou polinucleótido de teste e um de referência.

Como aqui utilizado, o termo pelo menos "90% idêntico a" refere-se a percentagens de identidade de 90 a 99,99 em relação aos polipéptidos de referência. Identidade a um nível de 90% ou mais é indicativa do facto de se compararem, assumindo para efeitos de exemplificação, um comprimento de polinucleótidos de teste e de referência de 100 aminoácidos. Não mais de 10% (*i.e.*,

10 em 100) de aminoácidos no polipéptido de teste diferem dos aminoácidos dos polipéptidos de referência. Comparações similares podem ser efectuadas entre polinucleótidos de teste e de referência. Estas diferenças podem ser representadas como mutações pontuais distribuídas aleatoriamente através de todo o comprimento de uma sequência de aminoácidos ou podem estar agrupadas em uma ou mais localizações de comprimento variável até ao máximo admissível, *e.g.* diferença de 10/100 aminoácidos (aproximadamente 90% de identidade). Diferenças são definidas como substituições, ou deleções, de ácido nucleico ou aminoácidos. Ao nível de homologias ou identidades acima de cerca de 85-90%, o resultado deverá ser independente do programa e do conjunto dos parâmetros de lacuna; estes elevados níveis de identidade podem ser avaliados prontamente, muitas vezes sem depender do *software*.

Como aqui utilizado, iniciador refere-se a um oligonucleótido contendo dois ou mais desoxirribonucleótidos ou ribonucleótidos, tipicamente mais de três, a partir do qual a síntese de um produto de extensão de iniciador pode ser iniciada. Condições experimentais conducentes à síntese incluem a presença de nucleósido-trifosfatos e de um agente para polimerização e extensão, tal como ADN-polimerase, e um tampão, temperatura e pH adequados.

Como aqui utilizados, animais incluem qualquer animal, tal como, mas não limitado a, cabras, vacas, veados, ovelhas, roedores, porcos e humanos. Animais não humanos excluem os humanos como o animal contemplado. As sHASEGP aqui proporcionadas são de qualquer fonte, animal, planta, procariota e fungo. A maioria das sHASEGP são de origem animal, incluindo origem mamífera.

Como aqui utilizado, terapia genética envolve a transferência de ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, em certas células de mamífero, células alvo de um mamífero, particularmente um ser humano, com um distúrbio ou condições para os quais esta terapia é procurada. O ácido nucleico, tal como ADN, é introduzido nas células alvo seleccionadas de um modo tal que o ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, é expresso e um produto terapêutico codificado é por isso produzido.

Alternativamente, o ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, pode de algum modo mediar a expressão de ADN que codifica o produto terapêutico, ou pode codificar um produto, tal como um péptido ou ARN, que de algum modo medeia, directamente ou indirectamente, a expressão de um produto terapêutico. A terapia genética pode também ser utilizada para entregar ácido nucleico codificando um produto génico que substitui um gene deficiente ou suplementa um produto génico produzido pelo mamífero ou célula nos quais é introduzido. O ácido nucleico introduzido pode codificar um seu composto terapêutico, tal como um inibidor de factor de crescimento, ou um factor de necrose de tumor ou um seu inibidor, tal como um receptor para o efeito, que não é normalmente produzido no hospedeiro mamífero ou que não é produzido em quantidades terapeuticamente eficazes ou num tempo terapeuticamente útil. O ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, codificando o produto terapêutico pode ser modificado antes da introdução nas células do hospedeiro afectado de modo a melhorar ou de outro modo alterar o produto ou a sua expressão. A terapia genética pode também envolver entrega de um inibidor ou repressor ou outro modulador da expressão génica.

Como aqui utilizado, ácido nucleico heterólogo é ácido nucleico (se ADN codifica ARN) e proteínas que não são normalmente produzidos *in vivo* pela célula na qual é expresso ou que medeia ou codifica mediadores que alteram a expressão de ácido nucleico endógeno, tal como ADN, afectando transcrição, tradução ou outros processos bioquímicos reguláveis. Ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, pode também ser referido como ácido nucleico estranho, tal como ADN. Qualquer ácido nucleico, tal como ADN, que um perito na especialidade reconhecerá ou considerará como heterólogo ou estranho para a célula na qual é expresso é aqui abrangido pelo termo ácido nucleico heterólogo; ácido nucleico heterólogo inclui ácido nucleico adicionado exogenamente que é também expresso endogenamente. Exemplos de ácido nucleico heterólogo incluem, mas não estão limitadas a, ácido nucleico que codifica proteínas marcadoras detectáveis, tais como uma proteína que confere resistência a fármaco, ácido nucleico que codifica substâncias terapeuticamente eficazes, tais como agentes anticanceroso, enzimas e hormonas, e ácido nucleico, tal como ADN, que codifica outros tipos de proteínas, tais como anticorpos. Anticorpos que

são codificados por ácido nucleico heterólogo podem ser segregados ou expressos sobre a superfície da célula na qual o ácido nucleico heterólogo foi introduzido.

Ácido nucleico heterólogo é geralmente não endógeno em relação à célula na qual é introduzido, mas foi obtido a partir de outra célula ou preparado sinteticamente.

Geralmente, ainda que não necessariamente, este ácido nucleico codifica ARN e proteínas que não são normalmente produzidos pela célula na qual é expresso.

Como aqui utilizado, um produto terapeuticamente eficaz é um produto que é codificado por ácido nucleico heterólogo, tipicamente ADN, tal que, por introdução do ácido nucleico num hospedeiro, é expresso um produto que melhora ou elimina os sintomas, manifestações de uma doença herdada ou adquirida ou que cura a doença.

Como aqui utilizada, a citação de que uma glicoproteína consiste essencialmente do domínio de hialuronidase significa que a única porção de sHASEGP do polipéptido é um domínio de hialuronidase ou uma sua porção cataliticamente activa. O polipéptido pode opcionalmente incluir, e geralmente incluirá, sequências de aminoácidos adicionais não derivadas de sHASEGP.

Como aqui utilizado, domínio refere-se a uma porção de uma molécula, *e.g.*, glicoproteínas ou os ácidos nucleicos de codificação, que é estruturalmente e/ou funcionalmente distinta de outras porções da molécula.

Como aqui utilizada, hialuronidase refere-se a uma enzima catalisando a hidrólise de glicosaminoglicanos.

Para clareza, a referência a hialuronidase refere-se a todas as formas, e formas particulares serão especificamente designadas. Para os presentes propósitos, o domínio de hialuronidase inclui as formas ligadas a membrana e as formas solúveis de uma proteína sHASEGP.

Como aqui utilizados, ácidos nucleicos incluem ADN, ARN e seus análogos, incluindo proteína-ácidos nucleicos (PNA) e suas

misturas. Os ácidos nucleicos pode ser de cadeia simples ou dupla. Quando se referem sondas ou iniciadores, opcionalmente marcados com um marcador detectável, tal como um marcador fluorescente ou radioactivo, são contempladas moléculas de cadeia simples. Tipicamente, estas moléculas são de um comprimento tal que o seu alvo é estatisticamente único ou de um número de cópias baixo (tipicamente inferior a 5, geralmente inferior a 3) para sondagem ou iniciação de uma biblioteca. Geralmente, uma sonda ou iniciador contém pelo menos 14, 16 ou 30 ácidos nucleicos contíguos de sequência complementar ou idêntica a um gene de interesse. Sondas e iniciadores podem ter 10, 20, 30, 50, 100 ou mais ácidos nucleicos de comprimento.

Como aqui utilizado, ácido nucleico codificando um fragmento ou porção de uma sHASEGP refere-se a um ácido nucleico codificando apenas o fragmento ou porção citado de sHASEGP, e não as outras porções contíguas da sHASEGP.

Como aqui utilizada, ligação operativa de ácido nucleico heterólogo a sequências de nucleótidos efectoras e reguladoras, tais como promotores, potenciadores, codões de paragem de transcrição e tradução, e outras sequências de sinal, refere-se à relação entre aquele ácido nucleico, tal como ADN, e estas sequências de nucleótidos. Por exemplo, a ligação operativa de ADN heterólogo a um promotor refere-se à relação física entre o ADN e o promotor tal que a transcrição deste ADN é iniciada a partir do promotor por uma ARN-polimerase que especificamente reconhece, se liga e transcreve o ADN em grelha de leitura (*reading frame*). Assim, ligado operativamente ou associado operacionalmente refere-se à relação funcional de ácido nucleico, tal como ADN, com sequências de nucleótidos efectoras e reguladoras, tais como promotores, potenciadores, locais de paragem de transcrição e tradução, e outras sequências de sinal. Por exemplo, a ligação operativa de ADN a um promotor refere-se à relação física e funcional entre o ADN e o promotor tal que a transcrição deste ADN é iniciada a partir do promotor por uma ARN-polimerase que especificamente reconhece, se liga e transcreve o ADN. De modo a optimizar a expressão e/ou a transcrição *in vitro*, pode ser necessário remover, adicionar ou alterar porções não traduzidas 5' dos clones para eliminar codões de iniciação (*i.e.* início) de tradução alternativos, inapropriados, potenciais, extra, ou outras sequências que

podem interferir com ou reduzir a expressão, ao nível quer da transcrição quer da tradução. Alternativamente, locais de ligação de ribossoma de consenso (ver, *e.g.*, Kozak J. Biol. Chem. 266: 19867-19870 (1991) podem ser inseridos imediatamente 5' do codão de início e podem intensificar a expressão. O adequabilidade (ou necessidade) de uma tal modificação pode ser determinada empiricamente.

Como aqui utilizado, por referência a oligonucleótidos anti-sentido, uma sequência complementar com pelo menos uma porção de um ARN significa uma sequência possuindo complementaridade suficiente para ser capaz de hibridar com o ARN, geralmente sob condições de rigor moderado ou elevado, formando um dúplex estável; no caso de ácidos nucleicos anti-sentido de sHASEGP de cadeia dupla, pode assim ser testada uma cadeia simples do ADN dúplex (ou ARNcd), ou pode ser ensaiada a formação de um tríplex. A capacidade para hibridar depende do grau de complementaridade e do comprimento do ácido nucleico anti-sentido. Geralmente, quanto mais comprido for o ácido nucleico de hibridação, mais erros de emparelhamento de bases com um ARN codificando sHASEGP pode conter e ainda assim formar um dúplex estável (ou tríplex, conforme o caso). Um perito na especialidade pode avaliar um grau tolerável de erros de emparelhamento por utilização de procedimentos padrão para determinar o ponto de fusão do complexo hibridado.

Para os presentes propósitos, podem ser efectuadas substituições de aminoácidos em qualquer das sHASEGP e seus domínios de hialuronidase desde que a proteína resultante exiba actividade de hialuronidase. Substituições de aminoácidos contempladas incluem substituições conservativas, tais como as apresentadas na Tabela 1, que não eliminam a actividade proteolítica. Como aqui descrito, são também contempladas substituições que alteram propriedades das proteínas, tais como remoção de locais de clivagem e de outros locais; estas substituições são geralmente não conservativas, mas podem ser efectuadas facilmente pelos peritos na especialidade.

Substituições conservativas adequadas de aminoácidos são conhecidas dos peritos nesta especialidade e podem ser efectuadas geralmente sem alterar a actividade biológica, por exemplo a actividade enzimática, da molécula resultante. Os

peritos nesta especialidade reconhecerão que, em geral, substituições de aminoácidos individuais em regiões não essenciais de um polipéptido não alteram substancialmente a actividade biológica (ver, *e.g.*, Watson *et al.* Molecular Biology of the Gene, 4.ª Edição, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224). Está também incluído na definição o fragmento cataliticamente activo de uma sHASEGP, particularmente uma porção de hialuronidase de cadeia simples. Substituições de aminoácidos conservativas são efectuadas, por exemplo, de acordo com as apresentadas na TABELA 1 como se segue:

TABELA 1. Substituições conservativas de resíduos originais Ala (A) Gly; Ser, Abu Arg (R) Lys, orn Asn (N) Gln; His Cys (C) Ser Gln (Q) Asn Glu (E) ASP Gly (G) Ala; Pro His (H) Asn; Gln Ile (I) Leu; Val; Met; Nle; Nva Leu (L); Val; Met; Nle; Nv Lys (K) Arg; Gln; Glu Met (M) Leu; Tyr; Ile; NLe Val Ornitina Lys; Arg Phe (F) Met; Leu; Tyr Ser (S) Thr Thr (T) Ser Trp (W) Tyr Tyr (Y) Trp; Phe Val (V) ILE; Leu; Met; Nle; Nv Outras substituições são também admissíveis e podem ser determinadas empiricamente ou de acordo com substituições conservativas conhecidas.

Como aqui utilizado, Abu é ácido 2-aminobutírico; Orn é ornitina. Como aqui utilizados, os aminoácidos que ocorrem nas várias sequências de aminoácidos aqui apresentadas, são identificados de acordo com as suas abreviaturas bem conhecidas de três letras ou de uma letra. Os nucleótidos, que ocorrem nos vários fragmentos de ADN são designados pelas designações padrão de uma única letra utilizadas rotineiramente na especialidade.

Como aqui utilizados, uma sonda ou iniciador com base numa sequência de nucleótidos aqui divulgada, inclui uma sequência de pelo menos 10, 14, tipicamente pelo menos 16 nucleótidos contíguos da SEQ ID NO:6, e sondas com uma sequência de pelo menos 30, 50 ou 100 nucleótidos contíguos da SEQ ID NO:6. O comprimento da sonda ou iniciador para uma hibridação única é uma função da complexidade do genoma de interesse.

Como aqui utilizada, a melhoria dos sintomas de um distúrbio particular por administração de uma composição farmacêutica particular refere-se a qualquer diminuição, seja

ela permanente ou temporária, duradoura ou transiente que possa ser atribuída ou associada à administração da composição.

Como aqui utilizados, polinucleótidos anti-sentido referem-se a sequências sintéticas de bases de nucleótidos complementares do ARNm ou da cadeia em sentido de ADN de cadeia dupla. A mistura de polinucleótidos em sentido e anti-sentido sob condições apropriadas conduz à ligação das duas moléculas, ou hibridação. Quando estes polinucleótidos se ligam a (hibridam com) ARNm, ocorre inibição da síntese de proteínas (tradução). Quando estes polinucleótidos se ligam a ADN de cadeia dupla, ocorre inibição da síntese de ARN (transcrição).

A inibição resultante da tradução e/ou transcrição conduz a uma inibição da síntese da proteína codificada pela cadeia em sentido. Uma molécula de ácido nucleico anti-sentido contém tipicamente um número suficiente de nucleótidos para especificamente se ligar a um ácido nucleico alvo, geralmente pelo menos 5 nucleótidos contíguos, frequentemente pelo menos 14 ou 16 ou 30 nucleótidos contíguos ou nucleótidos modificados complementares com a porção de codificação de uma molécula de ácido nucleico que codifica um gene de interesse, por exemplo, ácido nucleico codificando um domínio de hialuronidase de cadeia simples de uma sHASEGP.

Como aqui utilizado, um conjunto (*array*) refere-se a uma colecção de elementos, tais como anticorpos, contendo três ou mais membros. Um conjunto endereçável (*addressable array*) é um em que os membros do conjunto são identificáveis, tipicamente pela posição sobre um suporte de fase sólida. Deste modo, em geral, os membros do conjunto são imobilizados sobre *loci* identificáveis discretos sobre a superfície de uma fase sólida.

Como aqui utilizado, anticorpo refere-se a uma imunoglobulina, seja esta natural ou produzida parcialmente ou totalmente de modo sintético, incluindo um qualquer seu derivado que retém a capacidade de ligação específica do anticorpo. Por isso, o anticorpo inclui qualquer proteína possuindo um domínio de ligação que é homólogo ou substancialmente homólogo de um domínio de ligação de imunoglobulina. Anticorpos incluem membros de quaisquer cadeias de imunoglobulina, incluindo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

Como aqui utilizado, fragmento de anticorpo refere-se a qualquer derivado de um anticorpo que tem menos do que todo o comprimento, retendo pelo menos uma porção da capacidade de ligação específica do anticorpo a todo o comprimento. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a Fab, Fab', F(AB)2, Fvs de cadeia simples (scFV), FV, dsFV diacorpo e fragmentos Fd. O fragmento pode incluir múltiplas cadeias ligadas em conjunto, tais como por pontes de dissulfureto. Um fragmento de anticorpo contém geralmente pelo menos cerca de 50 aminoácidos e tipicamente pelo menos 200 aminoácidos.

Como aqui utilizado, um fragmento de anticorpo Fv é composto de um domínio pesado variável (VH) e de um domínio leve variável ligados por interacções não covalentes.

Como aqui utilizado, um dsFV refere-se a um Fv com uma ligação dissulfureto intermolecular introduzida por engenharia.

Como aqui utilizado, um fragmento F(AB)2 é um fragmento de anticorpo que resulta da digestão de uma imunoglobulina com pepsina a pH 4,0-4,5; pode ser expresso de modo recombinante para produzir o fragmento equivalente.

Como aqui utilizados, fragmentos Fab são fragmentos de anticorpo que resultam da digestão de uma imunoglobulina com papaína; podem ser expressos de modo recombinante para produzir o fragmento equivalente.

Como aqui utilizados, scFV referem-se a fragmentos de anticorpo que contêm uma cadeia leve variável V, e uma cadeia pesada variável (VH) ligadas covalentemente por um ligante polipeptídico por qualquer ordem. O ligante tem um comprimento tal que os dois domínios variáveis são ligados sem interferência substancial. Ligantes incluídos são resíduos $(Gly-Ser)_n$ com alguns resíduos Glu ou Lys dispersos através do ligante para aumentar a solubilidade.

Como aqui utilizados, anticorpos humanizados referem-se a anticorpos que são modificados para incluir sequências humanas de aminoácidos tal que a administração a um humano não provoca

uma resposta imunitária. São conhecidos métodos para preparação destes anticorpos. Por exemplo, para produzir estes anticorpos, o hibridoma ou outra célula procariota ou eucariota, tal como uma célula de *E. coli* ou uma célula CHO, que expressam o anticorpo monoclonal são alteradas por técnicas de ADN recombinante para exprimir um anticorpo no qual a composição de aminoácidos da região não variável é baseada em anticorpos humanos. Foram desenhados programas de computador para identificar estas regiões.

Como aqui utilizados, diacorpos são scFV diméricos; os diacorpos têm tipicamente ligantes de péptido mais curtos do que os scFV, e geralmente dimerizam.

Como aqui utilizada, produção por meios recombinantes por utilização de métodos ADN recombinante significa a utilização dos métodos bem conhecidos de biologia molecular para expressão de proteínas codificadas por ADN clonado.

Como aqui utilizado, o termo avaliação pretende incluir a determinação quantitativa e qualitativa no sentido da obtenção de um valor absoluto para a actividade de uma sHASEGP, ou de um seu domínio, presente na amostra, e também de obtenção de um índice, razão, percentagem, visual ou outro valor indicativo do nível da actividade. A avaliação pode ser directa ou indirecta e a espécie química realmente detectada não necessita obviamente de ser o próprio produto de proteólise mas pode ser, por exemplo, um seu derivado ou alguma outra substância.

Como aqui utilizada, actividade biológica refere-se às actividades *in vivo* de um composto ou respostas fisiológicas que resultam após administração *in vivo* de um composto, composição ou outra mistura. Actividade biológica abrange assim efeitos terapêuticos e actividade farmacêutica destes compostos, composições e misturas. Podem ser observadas actividades biológicas em sistemas *in vitro* desenhados para testar ou utilizar estas actividades. Assim, para os presentes propósitos, a actividade biológica de uma luciferase é a sua actividade de oxigenase pela qual, após oxidação de um substrato, é produzida luz.

Como aqui utilizado, actividade funcional refere-se a um polipéptido ou uma sua porção que exibe uma ou mais actividades associadas com uma proteína a todo o comprimento.

Actividades funcionais incluem, mas não estão limitadas a, actividade biológica, actividade catalítica ou enzimática, antigenicidade (capacidade para se ligar ou competir com um polipéptido para ligação a um anticorpo anti-polipéptido), imunogenicidade, capacidade para formar multímeros, a capacidade para se ligar especificamente a um receptor ou ligando para o polipéptido.

Como aqui utilizado, um conjugado refere-se aos compostos aqui proporcionados que incluem uma ou mais sHASEGP, incluindo uma sHASEGP, particularmente seus domínios de hialuronidase de cadeia simples, e um ou mais agentes de direccionamento. Estes conjugados incluem os produzidos por meios recombinantes como proteínas de fusão, os produzidos por meios químicos, tais como por acoplamento químico, por exemplo, através de acoplamento a grupos sulfidrilo, e os produzidos por qualquer outro método pelo qual pelo menos uma sHASEGP, ou um seu domínio, é ligada, directamente ou indirectamente através de ligante(es), a um agente de direccionamento.

Como aqui utilizado, um agente de direccionamento é qualquer porção, tal como uma proteína ou uma sua porção eficaz, que proporciona ligação específica do conjugado a um receptor de superfície de uma célula, que pode internalizar o conjugado ou sua porção de sHASEGP. Um agente de direccionamento pode também ser um que promove ou facilita, por exemplo, isolamento por afinidade ou purificação do conjugado; ligação do conjugado a uma superfície; ou detecção do conjugado ou de complexos contendo o conjugado.

Como aqui utilizado, um conjugado de anticorpo refere-se a um conjugado no qual o agente de direccionamento é um anticorpo.

Como aqui utilizado, derivado ou análogo de uma molécula refere-se a uma porção derivada da molécula ou uma versão modificada da molécula.

Como aqui utilizada, uma quantidade eficaz de um composto para tratamento de uma doença particular é uma quantidade que é suficiente para melhorar, ou de algum modo reduzir os sintomas associados à doença. Esta quantidade pode ser administrada como uma única dosagem ou pode ser administrada de acordo com um regime, segundo o qual é eficaz. A quantidade pode curar a doença mas, tipicamente, é administrada de modo a melhorar os sintomas da doença. Pode ser requerida administração repetida para conseguir a melhoria desejada de sintomas.

Como aqui utilizado, equivalente, quando se refere a duas sequências de ácidos nucleicos, significa que as duas sequências em questão codificam a mesma sequência de aminoácidos ou proteínas equivalentes. Quanto se utiliza equivalente referindo-se a duas proteínas ou péptidos, isto significa que as duas proteínas ou péptidos têm substancialmente a mesma sequência de aminoácidos apenas com substituições de aminoácidos (tais como, mas não limitadas a, alterações conservativas tais como as apresentadas na Tabela 1, acima) que não alteram substancialmente a actividade ou função da proteína ou péptido. Quando equivalente se refere a uma propriedade, a propriedade não necessita de estar presente na mesma extensão (*e.g.*, dois péptidos podem exibir diferentes taxas do mesmo tipo de actividade enzimática), mas as actividades são usualmente substancialmente as mesmas. Complementar, quando se refere a duas sequências de nucleótidos, significa que as duas sequências de nucleótidos são capazes de hibridar, tipicamente com menos do que 25%, 15%, 5% ou 0% de erros de emparelhamento entre nucleótidos opostos. Se necessário, a percentagem de complementaridade será especificada. Tipicamente, as duas moléculas são seleccionadas de tal modo que hibridarão sob condições de rigor elevado.

Como aqui utilizado, um agente que modula a actividade de uma proteína ou a expressão de um gene ou ácido nucleico quer diminui ou aumenta ou de outro modo altera a actividade da proteína, quer de algum modo supra-regula ou infra-regula ou de outro modo altera a expressão do ácido nucleico numa célula.

Como aqui utilizado, inibidor da actividade de uma sHASEGP abrange qualquer substância que proíbe ou diminui a produção, modificação(ões) pós-tradução, maturação ou localização na

membrana da sHASEGP ou qualquer substância que interfere com ou diminui a sua eficácia proteolítica, particularmente de uma forma de cadeia simples num ensaio de rastreio *in vitro*.

Como aqui utilizado, um método para tratamento ou prevenção de doença neoplásica significa que quaisquer dos sintomas, tais como o tumor, suas metástases, a vascularização dos tumores ou outros parâmetros pelos quais a doença é caracterizada, são reduzidos, melhorados, prevenidos, colocados num estado de remissão, ou mantidos num estado de remissão. Significa também que as marcas distintivas da doença neoplásica e metástases podem ser eliminadas, reduzidas ou prevenidas pelo tratamento. Exemplos não limitativos das marcas distintivas incluem degradação descontrolada da membrana basal e da matriz extracelular proximal, migração, divisão e organização das células endoteliais em novos capilares em funcionamento, e a persistência destes capilares em funcionamento.

Como aqui utilizados, sais farmaceuticamente aceitáveis, ésteres ou outros derivados dos conjugados incluem quaisquer sais, ésteres ou derivados que podem ser facilmente preparados pelos peritos nesta especialidade utilizando métodos conhecidos para esta derivatização e que produzem compostos que podem ser administrados a animais ou humanos sem efeitos tóxicos substanciais e que ou são fármacos activos ou são pró-fármacos.

Como aqui utilizado, um pró-fármaco é um composto que, após administração *in vivo*, é metabolizado ou de outro modo convertido na forma biologicamente, farmaceuticamente ou terapeuticamente activa do composto. Para produzir um pró-fármaco, o composto farmaceuticamente activo é modificado tal que o composto activo é regenerado por processos metabólicos. O pró-fármaco pode ser desenhado para alterar a estabilidade metabólica ou as características de transporte de um fármaco, para mascarar efeitos secundários ou toxicidade, para melhorar o sabor de um fármaco ou para alterar outras características ou propriedades de um fármaco. Em virtude do conhecimento dos processos farmacodinâmicos e do metabolismo de fármacos *in vivo*, uma vez conhecido um composto farmaceuticamente activo, os peritos nesta especialidade podem desenhar pró-fármacos do composto (ver, *e.g.*, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A

Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, páginas 388-392).

Como aqui utilizado, um fármaco identificado pelos métodos de rastreio aqui proporcionados refere-se a qualquer composto que é um candidato para utilização como um composto terapêutico ou como um composto-guia para o desenho de um composto terapêutico. Estes compostos podem ser moléculas pequenas, incluindo moléculas orgânicas pequenas, péptidos, peptidomiméticos, moléculas anti-sentido ou ARNcd, tais como ARNi, anticorpos, fragmentos de anticorpos, anticorpos recombinantes e outros destes compostos que podem servir como candidatos a fármaco ou compostos-guia.

Como aqui utilizado, um peptidomimético é um composto que mimetiza a conformação e certas particularidades estereoquímicas da forma biologicamente activa de um péptido particular. Em geral, os peptidomiméticos são desenhados para mimetizar certas propriedades desejáveis de um composto, mas não as propriedades indesejáveis, tais como flexibilidade, que conduzem a uma perda de uma conformação biologicamente activa e a quebra de ligações. Podem-se preparar peptidomiméticos a partir de compostos biologicamente activos substituindo certos grupos ou ligações que contribuem para as propriedades indesejáveis com bioisoésteres. Os bioisoésteres são conhecidos dos peritos na especialidade. Por exemplo, o bioisoéster de metileno CH2S tem sido utilizado como um substituto de amida em análogos de encefalina (ver, *e.g.* Spatola (1983) págs. 267-357 em Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weistein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, New York). A morfina, que pode ser administrada oralmente, é um composto que é um peptidomimético do péptido endorfina. Para os presentes propósitos, os péptidos cíclicos estão incluídos entre os peptidomiméticos.

Como aqui utilizada, uma região de promotor ou elemento promotor refere-se a um segmento de ADN ou ARN que controla a transcrição do ADN ou ARN ao qual está ligado operativamente. A região de promotor inclui sequências específicas que são suficientes para reconhecimento, ligação e iniciação da transcrição de ARN-polimerase.

Esta porção da região de promotor é referida como o promotor. Adicionalmente, a região de promotor inclui sequências que modulam esta actividade de reconhecimento, ligação e iniciação da transcrição de ARN-polimerase. Estas sequências podem ser de actuação *cis* ou podem ser responsivas a factores de actuação *trans*. Os promotores, dependendo da natureza da regulação, podem ser constitutivos ou regulados. Promotores exemplares contemplados para utilização em procariotas incluem os promotores de bacteriófago T7 e T3.

Como aqui utilizado, um receptor refere-se a uma molécula que tem uma afinidade por um dado ligando. Os receptores podem ser moléculas de ocorrência natural ou sintéticas. Os receptores podem também ser referidos na especialidade como anti-ligandos. Como aqui utilizados, receptor e anti-ligando são indiferenciáveis. Os receptores podem ser utilizados no seu estado inalterado ou como agregados com outras espécies. Os receptores podem ser ligados, covalentemente ou não covalentemente, ou estar em contacto físico com, a um membro de ligação, quer directamente quer indirectamente através de um substância de ligação específica ou ligante. Exemplos de receptores, incluem, mas não estão limitadas a: anticorpos, receptores de membrana celular, receptores de superfície e receptores de internalização, anticorpos monoclonais e anti-soros reactivos com determinantes antigénicos específicos tais como os de vírus, células ou outros materiais, fármacos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, péptidos, factores, lectinas, açúcares, polissacáridos, células, membranas celulares e organelos.

Exemplos de receptores e aplicações utilizando tais receptores, incluem mas não estão restringidos a: a) enzimas: proteínas de transporte específicas ou enzimas essenciais para sobrevivência de microrganismos, que podem servir como alvos para selecção de antibiótico [ligando]; b) anticorpos: pode-se investigar a identificação de um local de ligação de ligando sobre a molécula de anticorpo que se combina com o epítopo de um antigénio de interesse; a determinação de uma sequência que mimetiza um epítopo antigénico pode conduzir ao desenvolvimento de vacinas cujo imunogénio é baseado em uma ou mais destas sequências ou pode conduzir ao desenvolvimento de agentes de diagnóstico relacionados ou compostos úteis em tratamentos

terapêuticos tais como para doenças auto-imunes; c) ácidos nucleicos: identificação de locais de ligação de ligando, tais como proteína ou ARN; d) polipéptidos catalíticos: polímeros, incluindo polipéptidos, que são capazes de promover uma reacção química envolvendo a conversão de um ou mais reagentes em um ou mais produtos; tais polipéptidos incluem geralmente um local de ligação específico para pelo menos um reagente ou intermediário de reacção e uma funcionalidade activa próxima do local de ligação, em que a funcionalidade é capaz de modificar quimicamente o reagente ligado (ver, *e.g.*, Patente U.S. N.º 5215899); e) receptores de hormona: a determinação dos ligandos que se ligam com elevada afinidade a um receptor é útil no desenvolvimento de terapias de substituição de hormonas; por exemplo, a identificação de ligandos que se ligam a estes receptores pode conduzir ao desenvolvimento de fármacos para controlar a pressão sanguínea; e f) receptores opiáceos: a determinação de ligandos que se ligam aos receptores opiáceos no cérebro é útil no desenvolvimento de substitutos menos causadores de dependência para morfina e drogas relacionados.

Como aqui utilizada, amostra refere-se a qualquer coisa que pode conter um analito para o qual é desejado um ensaio do analito. A amostra pode ser uma amostra biológica, tal como um fluido biológico ou um tecido biológico. Exemplos de fluidos biológicos incluem urina, sangue, plasma, soro, saliva, sémen, fezes, esputo, fluido cerebrospinal, lágrima, muco, esperma, fluido amniótico ou outros. Os tecidos biológicos são agregados de células, usualmente de um tipo particular em conjunto com a sua substância intercelular que forma um dos materiais estruturais de uma estrutura humana, animal, de planta, bacteriana, fúngica ou viral, incluindo tecidos conjuntivos, de epitélio, músculo e nervo. Exemplos de tecidos biológicos incluem também órgãos, tumores, nódulos linfáticos, artérias e células individuais.

Como aqui utilizado: rigor de hibridação na determinação da percentagem de erros de emparelhamento é como se segue: 1) rigor elevado: SSPE 0,1x, 0,1% de SDS, 65°C; 2) médio rigor: SSPE 0,2x, 0,1% de SDS, 50°C; 3) rigor baixo: SSPE 1,0x, 0,1% de SDS, 50°C. Os peritos nesta especialidade sabem que o passo de lavagem selecciona os híbridos estáveis e conhecem também os ingredientes de SSPE (ver, *e.g.*, Sambrook, E.F. Fritsch, T.

Maniatis, em: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989 Vol. 3, pág. B. 13, ver também numerosos catálogos que descrevem soluções de laboratório habitualmente utilizadas). O SSPE é NaCl 0,18 M tamponado com fosfato a pH 7,4. Adicionalmente, os peritos na especialidade reconhecem que a estabilidade de híbridos é determinada por TmT que é uma função da concentração de ião sódio e da temperatura (Tm = 81,5°C-16,6+0,41(%G+C)-600/L)) pelo que os únicos parâmetros nas condições de lavagem críticos para a estabilidade do híbrido são a concentração de ião sódio no SSPE (ou SSC) e a temperatura.

É entendido que se podem conseguir rigores equivalentes utilizando tampões, sais e temperaturas alternativos. Como exemplo, e não como limitação, procedimentos utilizando condições de rigor baixo são como se segue (ver também Shilo e Weinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6789-6792 (1981)): Filtros contendo ADN são pré-tratados durante 6 horas a 40ºC numa solução contendo 35% de formamida, SSC 5x, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, 0,1% de PVP, 0,1% de Ficoll, 1% de BSA e 500 µg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado (SSC 10x é cloreto de sódio 1,5 M, e citrato de sódio 0,15 M, ajustado a um pH de 7).

As hibridações são realizadas na mesma solução com as modificações seguintes: 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll, 0,2% de BSA, 100 µg/ml de ADN de esperma, 10% (p/vol) de sulfato de dextrano, e utiliza-se sonda marcada com ^{32}P 5-20×10^6 cpm. Incubam-se os filtros em mistura de hibridação durante 18-20 horas a 40ºC e depois lavam-se durante 1,5 horas a 55ºC numa solução contendo SSC 2x, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, e 0,1% de SDS. A solução de lavagem é substituída por solução fresca e incubada 1,5 horas adicionais a 60ºC. Os filtros são manchados a seco e expostos para autorradiografia. Se necessário, os filtros são lavados por uma terceira vez a 65-68ºC e de novo expostos a película. Outras condições de rigor baixo que podem ser utilizadas são bem conhecidas na especialidade (*e.g.* como as utilizadas para hibridações de espécies cruzadas).

Como exemplo e não como limitação, procedimentos utilizando condições de rigor moderado incluem, por exemplo,

mas não estão limitadas a, procedimentos utilizando as condições de rigor moderado são como se segue: Filtros contendo ADN são pré-tratados durante 6 horas a 55ºC numa solução contendo SSC 6x, solução de Denhart 5x, 0,5% de SDS e 100 µg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado. As hibridações são realizadas na mesma solução e utiliza-se sonda marcada com ^{32}P 5-20×10^6 cpm. Incubam-se os filtros em mistura de hibridação durante 18-20 horas a 55ºC e depois lavam-se duas vezes durante 30 minutos a 60ºC numa solução contendo SSC 1x e 0,1% de SDS. Os filtros são manchados a seco e expostos para autorradiografia. Outras condições de rigor moderado que podem ser utilizadas são bem conhecidas na especialidade. A lavagem dos filtros é efectuada a 37ºC durante 1 hora numa solução contendo SSC 2x, 0,1% de SDS.

Como exemplo e não como limitação, procedimentos utilizando condições de rigor elevado são como se segue: A pré-hibridação de filtros contendo ADN é realizada durante 8 horas até de um dia para o outro a 65ºC em tampão composto de SSC 6x, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll, 0,02% de BSA, e 500 µg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado. Hibridam-se os filtros durante 48 horas a 65°C em mistura de pré-hibridação contendo 100 µg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado e sonda marcada com ^{32}P 5-20×10^6 cpm. A lavagem de filtros é efectuada a 37ºC durante 1 hora numa solução contendo SSC 2x, 0,01% de PVP, 0,01% de Ficoll e 0,01% de BSA. A esta lavagem segue-se uma lavagem em SSC 0,1x a 50ºC durante 45 minutos antes da autorradiografia. Outras condições de rigor elevado que podem ser utilizadas são bem conhecidas na especialidade.

O termo substancialmente idêntico ou substancialmente homólogo ou similar varia com o contexto como entendido pelos peritos na especialidade relevante e significa geralmente pelo menos 60% ou 70%, preferivelmente significa pelo menos 80%, 85% ou mais preferivelmente pelo menos 90%, e muito preferivelmente pelo menos 95% de identidade.

Como aqui utilizado, substancialmente idêntico a um produto significa suficientemente similar tal que a propriedade de interesse é suficientemente inalterada tal que o produto substancialmente idêntico pode ser utilizado em vez do produto.

Como aqui utilizado, substancialmente puro significa suficientemente homogéneo para aparecer livre de impurezas facilmente detectáveis como determinado por métodos de análise padrão, tais como cromatografia de camada fina (TLC), electroforese em gel e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizados pelos peritos na especialidade para avaliar esta pureza, ou suficientemente puro tal que a purificação adicional não altera de modo detectável as propriedades físicas e químicas, tais como actividades enzimáticas e biológicas, da substância. Métodos para purificação dos compostos para produzir compostos substancialmente quimicamente puros são conhecidos dos peritos na especialidade. Um composto substancialmente quimicamente puro pode porém ser uma mistura de estereoisómeros ou isómeros. Nestes casos, a purificação adicional poderá aumentar a actividade específica do composto.

Como aqui utilizada, célula alvo refere-se a uma célula que expressa uma sHASEGP *in vivo*.

Como aqui utilizada, substância de teste (ou composto de teste) refere-se a um composto definido quimicamente (*e.g.*, moléculas orgânicas, moléculas inorgânicas, moléculas orgânicas/inorgânicas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, lípidos, polissacáridos, sacáridos, ou híbridos entre estas moléculas tais como glicoproteínas, etc.) ou misturas de compostos (*e.g.*, uma biblioteca de compostos de teste, extractos naturais ou sobrenadantes de cultura, etc.) cujo efeito numa sHASEGP, particularmente uma forma de cadeia simples que inclui o domínio de hialuronidase ou uma sua porção suficiente para actividade, como determinado por um método *in vitro*, tal como os ensaios aqui proporcionados.

Como aqui utilizados, os termos um agente terapêutico, regime terapêutico, radioprotector ou quimioterapêutico significam fármacos e terapias com fármaco convencionais, incluindo vacinas, que são conhecidos dos peritos na especialidade. Agentes radioterapêuticos são bem conhecidos na especialidade.

Como aqui utilizado, tratamento significa qualquer modo pelo qual os sintomas de uma condição, distúrbio ou doença são melhorados ou de outro modo alterados beneficamente.

Tratamento abrange também qualquer utilização farmacêutica das presentes composições.

Como aqui utilizado, vector (ou plasmídeo) refere-se a elementos discretos que são utilizados para introduzir ácido nucleico heterólogo no interior de células quer para a sua expressão quer para a sua replicação. Tipicamente, os vectores permanecem epissómicos, mas podem ser desenhados para efectuar a integração de um gene ou de uma sua porção num cromossoma do genoma. São também contemplados vectores que são cromossomas artificiais, tais como cromossomas artificiais de levedura e cromossomas artificiais de mamífero. A selecção e utilização destes veículos são bem conhecidas dos peritos na especialidade. Um vector de expressão inclui vectores capazes de expressarem ADN que está ligado operativamente a sequências reguladoras, tais como regiões de promotor, que são capazes de efectuar a expressão destes fragmentos de ADN. Assim, um vector de expressão refere-se a uma construção de ARN ou ADN recombinante, tal como um plasmídeo, um fago, um vector de vírus recombinante ou outro vector que, após introdução numa célula hospedeira apropriada, resulta na expressão do ADN clonado. Vectores de expressão apropriados são bem conhecidos dos peritos na especialidade e incluem aqueles que são replicáveis em células eucariotas e/ou células procariotas e aqueles que permanecem epissómicos ou aqueles que se integram no genoma da célula hospedeira.

Como aqui utilizada, sequência de ligação de proteína refere-se a uma sequência de proteína ou péptido que é capaz de ligação específica a outras sequências de proteína ou péptido de modo geral, a um conjunto de sequências de proteína ou péptido ou a uma sequência de proteína ou péptido particular.

Como aqui utilizado, epítopo marcador refere-se a uma extensão curta de resíduos de aminoácido correspondendo a um epítopo para facilitar a análise bioquímica e imunológica subsequente da proteína ou péptido marcados com epítopo. A marcação epitópica é conseguida incluindo a sequência do epítopo

marcador para a sequência de codificação de proteína num vector de expressão apropriado. As proteínas marcadas com epítopo podem ser purificadas por afinidade utilizando anticorpos altamente específicos criados contra os marcadores.

Como aqui utilizada, sequência de ligação de metal refere-se a uma sequência de proteína ou péptido que é capaz de ligação específica a iões metálicos de modo geral, a um conjunto de iões metálicos ou a um ião metálico particular.

Como aqui utilizada, uma combinação refere-se a qualquer associação entre dois ou entre mais itens.

Como aqui utilizada, uma composição refere-se a qualquer mistura. Pode ser uma solução, uma suspensão, líquido, pó, uma pasta, aquoso, não aquoso ou qualquer sua combinação.

Como aqui utilizado, fluido refere-se a qualquer composição que pode fluir. Fluidos abrangem assim composições que estão na forma de semi-sólidos, pastas, soluções, misturas aquosas, géis, loções, cremes e outras destas composições.

Como aqui utilizado, um extracto celular refere-se a uma preparação ou fracção que é produzida a partir de uma célula lisada ou desfeita.

Como aqui utilizado, diz-se que um agente é seleccionado aleatoriamente quando o agente é escolhido aleatoriamente sem considerar as sequências específicas envolvidas na associação de uma proteína sozinha ou com os seus substratos associados, parceiros de ligação, etc. Um exemplo de agentes seleccionados aleatoriamente é a utilização de uma biblioteca química ou de uma biblioteca combinatória de péptido, ou de um caldo de crescimento de um organismo ou meio condicionado.

Como aqui utilizado, diz-se que um agente é seleccionado ou desenhado racionalmente quando o agente é escolhido numa base não aleatória que tem em consideração a sequência do local alvo e/ou a sua conformação em relação à acção do agente. Como descrito nos Exemplos, existem locais de ligação propostos para a hialuronidase e locais (catalíticos) na glicoproteína possuindo a SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:4. Agentes podem ser

seleccionados racionalmente ou desenhados racionalmente utilizando as sequências peptídicas que constituem estes locais. Por exemplo, um agente peptídico seleccionado racionalmente pode ser um péptido cuja sequência de aminoácidos é idêntica aos domínios ou locais de ligação de ATP ou calmodulina.

Considera-se que os oligossacáridos têm uma extremidade redutora e uma extremidade não redutora, se o sacárido na extremidade redutora for ou não de facto um açúcar redutor. De acordo com a nomenclatura aceite, os oligossacáridos são aqui ilustrados com a extremidade não redutora à esquerda e a extremidade redutora à direita. Todos os oligossacáridos aqui descritos são descritos com o nome ou abreviatura para o sacárido não redutor (*e.g.*, Gal), seguido pela configuração da ligação glicosídica (alfa ou beta), a ligação de anel, a posição de anel do sacárido redutor envolvido na ligação, e depois o nome ou abreviatura do sacárido redutor (*e.g.*, GlcNAc). A ligação entre dois açúcares pode ser expressa, por exemplo, como 2,3, 2.fw darw.3, ou (2,3). Cada sacárido é uma piranose.

Como aqui utilizada, porção açúcar ligada a N refere-se a um oligossacárido ligado a uma sHASEGP através do azoto de amida de resíduos Asn. Os oligossacáridos ligados a N caem em vários tipos principais (oligomanose, complexo, híbrido, sulfatado), que possuem todos núcleos (Man)3-GlcNAc-GlcNAc- ligados através do azoto de amida de resíduos Asn que se situam dentro de sequências -Asn-Xaa-Thr/Ser- (onde Xaa não é Pro). Locais ligados a N são muitas vezes atribuídos indirectamente pelo aparecimento de um ciclo em "branco" durante a sequenciação. A identificação positiva pode ser efectuada após libertação do oligossacárido por PNGase F, que converte a Asn glicosilada em Asp. Após libertação por PNGase F, os oligossacáridos ligados a N podem ser purificados utilizando cromatografia em Bio-Gel P-6, com as fracções combinadas de oligossacárido submetidas a cromatografia de permuta aniónica a pH elevado (HPAEC) preparativa (Townsend *et al.*, (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). Certos isómeros de oligossacárido podem ser resolvidos utilizando HPAEC. Resíduos fucose desviarão as posições de eluição para mais cedo no cromatograma de HPAEC, enquanto resíduos ácido siálico adicionais aumentarão o tempo de retenção. O tratamento concorrente de glicoproteínas cujas

estruturas de oligossacárido são conhecidas (*e.g.*, fetuína de bovino, glicoproteína ácida a-1, ovalbumina, ARNase B, transferrina) pode facilitar a atribuição dos picos de oligossacárido. Os oligossacáridos recolhidos podem ser caracterizados por uma combinação de análises de composição e de ligações de metilação (Waeghe*et al.*, (1983) Carbohydr. Res. 123, 281-304.), com as configurações anoméricas atribuídas por espectroscopia de RMN (Van Halbeek (1993) em Methods Enzymol. 230).

Alternativamente, os oligossacáridos podem ser identificados por electroforese de carboidratos assistida por fluorescência (FACE, *fluorescence assisted carbohydrate electrophoresis*), Callewaert *et al.* (2001) Glycobiology 11, 275-281.

Como aqui utilizado, o termo "ácido siálico" refere-se a qualquer membro de uma família de açúcares carboxilados de nove carbonos. O membro mais comum da família de ácido siálico é o ácido N-acetilneuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico (frequentemente abreviado como Neu5Ac, NeuAc ou NANA). Um segundo membro da família é o ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc ou NeuGc), no qual o grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Um terceiro membro da família de ácido siálico é o ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano *et al.* (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori *et al.* (1990) J. Biol. Chem. 265: 21811-21819. São também incluídos ácidos siálicos 9-substituídos tais como um 9-O-C.sub.1 -C.sub.6 acil-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac ou 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac e 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para uma revisão da família do ácido siálico, ver, *e.g.*, Varki (1992) Glycobiology 2: 25-40; Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, N.Y. (1992)). A síntese e utilização de compostos de ácido siálico num procedimento de sialação é divulgada no pedido de patente internacional WO 92/16640, publicado em 1 de Outubro de 1992.

Como aqui utilizado, PNGase refere-se a uma N-glicosidase F específica de péptido de asparagina tal como a péptido-N-glicosidase F de *Flavobacterium maningoseptum*. As enzimas PNGase são caracterizadas pela sua especificidade em relação a

oligossacáridos ligados a N em vez de oligossacáridos ligados a O. A caracterização da eficácia de PNGase pode ser definida por electroforese de SDS-PAGE ou por electroforese de carboidrato assistida por fluorescência.

Como aqui utilizada, sialação substancialmente terminal refere-se a oligossacáridos ligados a N terminando com um resíduo ácido siálico como um açúcar terminal. Os ácidos siálicos terminais podem ser identificados por análise FACE de carboidratos libertados após tratamento com neuraminidase.

O tempo de vida de glicoproteínas em circulação no sangue está altamente dependente da composição e estrutura dos seus grupos carboidrato ligados a N. Este facto é de relevância directa para glicoproteínas terapêuticas que se pretende que sejam administradas parentericamente. Em geral, a meia-vida em circulação máxima de uma glicoproteína requer que os seus grupos carboidrato ligados a N terminem na sequência NeuAc-Gal-GlcNAc. Sem o ácido siálico terminal (NeuAc), a glicoproteína é rapidamente eliminada do sangue por um mecanismo envolvendo o reconhecimento dos resíduos N-acetilgalactosamina (GalNAc) ou galactose (Gal) subjacentes (Goochee *et al.* (1991) Biol/Technology 9: 1347-1355). Por esta razão, assegurar a presença de ácido siálico terminal nos grupos carboidrato ligados a N de glicoproteínas terapêuticas é uma consideração importante para o seu desenvolvimento comercial.

As glicoproteínas em circulação são expostas a sialidase(s) (ou neuraminidase) que podem remover resíduos ácido siálico terminais. Tipicamente, a remoção do ácido siálico expõe resíduos galactose, e estes resíduos são reconhecidos e ligados por receptores específicos de galactose em hepatócitos (revisto em Ashwell e Harford (1982) Ann. Rev. Biochem. 51:531). O fígado contém também outros receptores específicos de açúcar que medeiam a remoção de glicoproteínas da circulação. As especificidades destes receptores incluem também N-acetilglucosamina, manose, fucose e fosfomanose. As glicoproteínas depuradas pelos receptores de galactose de hepatócitos sofrem degradação substancial e depois entram na bílis; as glicoproteínas depuradas pelo receptor de manose de células de Kupffer entram no sistema reticuloendotelial (revisto em Ashwell e Harford (1982) Ann. Rev. Biochem. 51:53).

Como aqui utilizada, activa em meio neutro refere-se a uma glicoproteína sHASEGP com actividade catalítica em relação a um substrato de glicosaminoglicano *in vitro* a um pH entre 5 e 8 sob condições de sal inferior a 150 mM e uma força de tampão inferior a 50 mM.

Como aqui utilizada, uma solução estabilizada refere-se a uma sHASEGP que mantém mais de 60% da sua actividade inicial após armazenamento à temperatura ambiente durante 30 dias.

Como aqui utilizada, a não ser que especificado de outro modo, uma unidade é expressa em unidades de redução da turvação (TRU). Uma TRU é definida como a quantidade de actividade de hialuronidase requerida para reduzir a turvação de uma solução acidificada de ácido hialurónico e é equivalente às unidades U.S.P./National Formulary (NF XIII) (NFU). O ensaio enzimático do tipo ELISA aqui descrito pode ser relacionado com as unidades TRU, NFU e U.S.P. através de uma curva de calibração de uma amostra de hialuronidase (*e.g.*, norma USP ou WHO) normalizada através da U.S.P. Deste modo, as actividades de enzima determinadas pelo ensaio enzimático do tipo ELISA são realmente TRU relativas, uma vez que a actividade enzimática não é realmente medida utilizando o ensaio turbidométrico (Dorfman *et al.*, 1948, J. Biol. Chem. 172:367).

Como aqui utilizada, potência é definida pela quantidade de proteína sHASEGP requerida para degradar substrato *in vitro* com base numa Unidade de Redução de Turvação ou numa Unidade de Redução de Turvação Relativa.

Como aqui utilizada, actividade específica refere-se a unidades de actividade por mg de proteína. A quantidade de proteína sHASEGP é definida pela absorção de uma solução de sHASEGP a 280 nm assumindo um coeficiente de extinção molar de aproximadamente 1,7, em unidades de M^{-1} cm^{-1}.

O polietilenoglicol (PEG) tem sido amplamente utilizado em biomateriais, biotecnologia e medicina principalmente porque o PEG é um polímero biocompatível, não tóxico, não imunogénico e solúvel em água (Zhao e Harris, ACS Symposium Series 680: 458-72, 1997). Na área da entrega de fármacos, derivados de PEG

derivados têm sido amplamente utilizados em ligação covalente (*i.e.*, "PEGuilação") a proteínas para reduzir a imunogenicidade, a proteólise e a depuração pelo rim, e para melhorar a solubilidade (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16:157-82, 1995). Similarmente, o PEG tem sido ligado a fármacos de peso molecular baixo, relativamente hidrófobos, para melhorar a solubilidade, reduzir a toxicidade e alterar a biodistribuição. Tipicamente, os fármacos PEGuilados são injectados como soluções.

Uma aplicação relacionada é a síntese de redes ou formulações de PEG degradáveis reticuladas para utilização na entrega de fármacos, uma vez que muita da mesma química utilizada no desenho de transportadores de fármaco, solúveis, degradáveis, pode também ser utilizada no desenho de géis degradáveis (Sawhney *et al.*, Macromolecules 26: 581-87, 1993). É também conhecido que podem ser formados complexos intermacromoleculares misturando soluções de dois polímeros complementares. Estes complexos são geralmente estabilizados por interacções electrostáticas (polianião-policatião) e/ou ligações de hidrogénio (poliácido-polibase) entre os polímeros envolvidos, e/ou por interacções hidrófobas entre os polímeros na envolvente aquosa (Krupers *et al.*, Eur. Polym J. 32:785-790, 1996). Por exemplo, a mistura de soluções de poli(ácido acrílico) (PAAc) e de poli(óxido de etileno) (PEO), sob as condições apropriadas, resulta na formação de complexos baseados sobretudo em ligação de hidrogénio. A dissociação destes complexos nas condições fisiológicas tem sido utilizada para entrega de fármacos livres (*i.e.*, não PEGuilados). Adicionalmente, têm sido formados complexos de polímeros complementares a partir tanto de homopolímeros como de copolímeros.

Num aspecto, o polietilenoglicol tem um peso molecular na gama de cerca de 3 kD a cerca de 50 kD, e preferivelmente de cerca de 5 kD a cerca de 30 kD. A ligação covalente do PEG ao fármaco (conhecida como "PEGuilação") pode ser efectuada por técnicas de síntese química conhecidas. Por exemplo, num aspecto do presente invento, a PEGuilação de proteína pode ser efectuada fazendo reagir PEG activado com NHS com a proteína sob condições de reacção adequadas.

Embora tenham sido descritas numerosas reacções para PEGuilação, aquelas que são muito geralmente aplicáveis conferem direccionalidade, utilizam condições de reacção moderadas, e não necessitam de grande processamento a jusante para remover catalisadores tóxicos ou subprodutos. Por exemplo, o monometoxiPEG (mPEG) possui apenas um hidroxilo terminal reactivo, e assim a sua utilização limita alguma da heterogeneidade da mistura de produto de PEG-proteína resultante. A activação do grupo hidroxilo na extremidade do polímero oposta ao grupo metoxi terminal é geralmente necessária para efectuar a PEGuilação eficiente da proteína, sendo o objectivo tornar o PEG derivatizado mais susceptível a ataque nucleófilo. O nucleófilo atacante é usualmente o grupo épsilon-amino de um resíduo lisilo, mas outras aminas podem também reagir (*e.g.* a alfa-amina N-terminal ou as aminas de anel de histidina) se as condições locais forem favoráveis. É possível uma ligação mais dirigida em proteínas contendo uma única lisina ou cisteína. Este último resíduo pode ser visado por PEG-maleimida para uma modificação específica de tiol. Alternativamente, PEG-hidrazida pode ser reagida com sHASEGP oxidada com periodato e reduzida na presença de $NaCNBH_3$. Mais especificamente, açúcares de CMP PEGuilados podem ser reagidos com sHASEGP na presença de glicosil-transferases apropriadas. Uma técnica é a técnica de "PEGuilação" onde várias moléculas poliméricas são acopladas ao polipéptido em questão. Quando se utiliza esta técnica, o sistema imunitário tem dificuldades em reconhecer os epítopos na superfície do polipéptido responsáveis pela formação de anticorpos, reduzindo-se assim a resposta imunitária. Para polipéptidos introduzidos directamente no sistema circulatório do corpo humano para dar um efeito fisiológico particular (*i.e.* produtos farmacêuticos), a resposta imunitária potencial típica é uma resposta IgG e/ou IgM, embora polipéptidos que são inalados através do sistema respiratório (*i.e.* polipéptido industrial) possam causar potencialmente uma resposta de IgE (*i.e.* resposta alérgica). Uma das teorias que explica a resposta imunitária reduzida é que a molécula ou moléculas poliméricas encobrem os epítopos na superfície do polipéptido responsáveis pela resposta imunitária conduzindo a formação de anticorpos. Outra teoria, ou pelo menos um factor parcial, é que quanto mais pesado for o conjugado, mais reduzida é a resposta imunitária obtida.

As moléculas poliméricas acopladas ao polipéptido podem ser qualquer molécula polimérica adequada com um peso molecular como definido de acordo com o invento, incluindo homopolímeros naturais e sintéticos, tais como polióis (*i.e.* poli-OH), poliaminas (*i.e.* poli-NH_2) e poli(ácidos carboxílicos) (*i.e.* poli-COOH), e ainda heteropolímeros *i.e.* polímeros compreendendo um ou mais grupos de acoplamento diferentes *e.g.* um grupo hidroxilo e grupos amina.

Exemplos de moléculas poliméricas adequadas incluem moléculas poliméricas seleccionadas entre o grupo compreendendo poli(óxidos de alquileno) (PAO), tais como polialquilenoglicóis (PAG), incluindo polipropilenoglicóis (PEG), metoxipolietilenoglicóis (mPEG) e polipropilenoglicóis, éteres de glicidilo-PEG (Epox-PEG), PEG-oxicarbonilimidazole (CDI-PEG), polietilenoglicóis ramificados (PEG), poli(álcool vinílico) (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli-D,L-aminoácidos, polietileno-co-anidrido de ácido maleico, poliestireno-co-anidrido de ácido málico, dextranos incluindo carboximetildextranos, heparina, albumina homóloga, celuloses, incluindo metilcelulose, carboximetilcelulose, etilcelulose, hidroxietilcelulose, carboxietilcelulose e hidroxipropilcelulose, hidrolisados de quitosano, amidos tais como hidroxietil-amidos e hidroxipropil-amidos, glicogénio, agaroses e seus derivados, goma de guár, pululano, inulina, goma de xantano, carragenano, pectina, hidrolisados de ácido algínico e biopolímeros.

Moléculas poliméricas preferidas são moléculas poliméricas não tóxicas tais como (m)polietilenoglicol (mPEG) que requerem adicionalmente uma química relativamente simples para o seu acoplamento covalente a grupos de ligação na superfície da enzima.

Em termos gerais, poli(óxidos de alquileno) (PAO), tais como poli(óxidos de etileno), tais como PEG e especialmente mPEG, são as moléculas poliméricas preferidas, uma vez que estas moléculas poliméricas, em comparação com polissacáridos tais como dextrano, pululano e outros, têm poucos grupos reactivos susceptíveis de reticulação, o que é indesejável.

B. PERFIS DE EXPRESSÃO DE sHASEGP EM TECIDO.

Embora anteriormente se pensasse que era específica dos testículos, a sHASEGP humana é expressa em múltiplos tecidos em humanos quando se utilizam técnicas mais sensíveis tais como RT-PCR. Transcritos de sHASEGP são encontrados em medula (cérebro), endotélio microvascular, próstata, mama, retina, melanócitos humanos reunidos, coração fetal e útero de grávida. A sHASEGP é também expressa em tumores de células germinais. É geralmente requerida a detecção de transcritos de sHASEGP baseada em RT-PCR para detectar níveis noutros tecidos que não em testículos.

C. ENSAIOS PARA ACTIVIDADE DA ENZIMA sHASEGP

ENSAIO DE MICROTITULAÇÃO TURBIDOMÉTRICA PARA ACTIVIDADE DE HIALURONIDASE

A actividade de hialuronidase pode ser detectada através de um ensaio turbidométrico modificado em solução de soro acidificada. Os reagentes necessários são como se segue:

Água desionizada 2X esterilizada por UV ou água estéril para irrigação	Braun	R5000-01
Hylumed Medical - hialuronato de sódio, HA de peso molecular elevado	Genzyme Advanced Biomaterials	4876
Padrão de referência de hialuronidase	USP	31200
Acetato de potássio, granular, USP, ACS	JTBaker	2914-01
Ácido acético, glacial, +99%	Sigma	A-6283
Fosfato de sódio monobásico mono-hidratado, USP granular	Mallinkrodt	7774
Fosfato de sódio dibásico anidro, USP	Mallinkrodt	7771
Cloreto de sódio, cristais, GR, ACS	EMScience	SX0420-5
Hidrolisado enzimático de gelatina	Sigma	G-0262
Soro de cavalo, manada doadora, testado em cultura de células, testado em cultura de hibridoma, origem E.U.A.	Sigma	H-1270
Albumina de soro humano a 20%	Griffols	

Ácido clorídrico, reagente ACS	Sigma	H-7020
Cloreto de cálcio, di-hidrato, granular, USP, -FCC	JTBaker	1336-01

Prepararam-se os reagentes seguintes: Solução tampão de acetato - 14,0 g de acetato de potássio e 25,0 mL de ácido acético glacial em água para perfazer 1000 mL. Solução tampão de fosfato - 2,5 g de fosfato de sódio monobásico, 1,0 g de fosfato de sódio dibásico anidro, e 8,2 g de cloreto de sódio em água para perfazer 1000 mL. Solução de reserva diluente de enzima - 500 mL de solução tampão de fosfato com 500 mL de água. Solução de trabalho diluente de enzima - 33 mg de gelatina hidrolisada em 50 mL de solução de reserva diluente de enzima preparada menos de 2 horas antes da utilização. Solução tampão de estabilização de amostra (solução "SSB") - 125 µL de uma solução de albumina de soro de humano a 20% e 50 µL de uma solução de cloreto de cálcio 1 M em 50 mL de solução de trabalho diluente de enzima, e mistura-se exaustivamente. Solução de reserva de soro - Diluir 1 volume de soro de cavalo com 9 volumes de solução tampão de acetato. Ajustar com ácido clorídrico 4 N até um pH de 3,1 e deixar a solução em repouso à temperatura ambiente durante 18 a 24 horas. Armazenar a solução a 4°C, e utilizar no prazo de 30 dias. Solução de trabalho de soro - 10 mL da solução de reserva de soro em 30 mL da solução tampão de acetato, ajustada à temperatura ambiente. Solução de reserva de ácido hialurónico - Ácido hialurónico sódico até uma concentração 5,0 mg/mL em água. Solução de trabalho de ácido hialurónico - 0,75 mL da solução de reserva de ácido hialurónico em 4,25 mL da solução tampão de fosfato. Solução de reserva padrão - Um recipiente de padrão de referência de hialuronidase USP até uma concentração de 1000 Unidades/mL em água, dividido em partes alíquotas de 50 µL e armazenado a -20°C. Solução de trabalho padrão - 40 µL de solução de reserva padrão em 960 µL de solução de trabalho diluente de enzima para obter uma solução possuindo uma concentração conhecida de 40 Unidades/mL, preparada imediatamente antes da utilização no ensaio.

Todas as amostras de enzima são diluídas numa placa de 96 poços de "ligação de proteína baixa" de acordo com as linhas de orientação seguintes:

a) O intervalo de sensibilidade máxima deste ensaio está entre 10-30 Unidades/mL. Para minimizar o número de vezes que um ensaio tem de ser repetido de modo a obter resultados que estão dentro do intervalo, determina-se primeiro o número aproximado de unidades totais/mL para a amostra, e depois escolhe-se uma diluição (número inteiro) tal que a concentração final é aproximadamente 20 Unidades/ml.

b) Os volumes de amostra mínimos necessários para realizar o ensaio são como se segue: Fracções FPLC = 50 µL, Sobrenadantes de cultura de tecidos = 1 mL, Material purificado/concentrado/passo final = 10 µL.

c) Para amostras com diluições em série, são efectuadas diluições 1:10 na placa de 96 poços de "ligação de proteína baixa" em triplicado pipetando 360 µL da solução "SSB" e 40 µL de amostra para cada poço.

Para preparação do padrão USP preparar a curva de calibração USP na placa de 96 poços de "ligação de proteína baixa" como se segue:

Curva de calibração USP:

Poços:	**Padrão:**	**Solução diluente de enzima (em µL):**	**Solução de trabalho padrão (em µL):**	**Conc. final (em Unidades/mL):**
A1-A3	St01	0	100	40
B1-B3	St02	20	80	32
C1-C3	St03	40	60	24
D1-D3	St04	60	40	16
E1-E3	St05	80	20	8
F1-F3	St06	90	10	4
G1-G3	St07	100	0	0

Para preparação do controlo de ácido hialurónico nas colunas 1-3, o controlo de HA na placa de 96 poços de "fundo plano" é preparado como se segue:

Controlos de HA:

Poços:	**Controlo:**	**Solução de trabalho de ácido hialurónico (em µL):**	**Solução de trabalho diluente de enzima (em µL):**
H1-H3	Co01	0	60

A placa reaccional: Pipetam-se 30 µL por poço de solução de trabalho de ácido hialurónico utilizando uma pipeta de transferência de 8 canais de 50 µL para uma placa de microtitulação de 96 poços de "fundo plano" deixando os poços H1-H3 vazios. Pipetam-se 60 µL/poço de solução de trabalho diluente de enzima para os poços H1-H3 da mesma placa como o controlo de HA.

Solução de trabalho de soro: Dispensam-se 40 mL de solução de trabalho de soro para uma bacia de transferência e em seguida para o bloco de aquecimento.

Etapa de pré-aquecimento: Uma vez preparadas ambas as placas, a placa de 96 poços de "ligação de proteína baixa" contendo as amostras diluídas, padrões, controlos e a placa de 96 poços de fundo plano contendo a solução de trabalho de ácido hialurónico são colocadas num bloco de aquecimento e depois deixam-se aquecer durante 5 min a 37°C.

A reacção é iniciada pela adição de enzima ao substrato: 30 µL a partir da placa de enzima em todos os poços na coluna #1 da placa de fundo plano de 96 poços (contendo o substrato) utilizando uma pipeta de 8 canais de 5-50 µL. A mistura reaccional de enzima/substrato é aspirada 5 vezes (arrastando a solução para cima e para baixo com o dispositivo de transferência durante os primeiros 15 segundos para assegurar a mistura completa da amostra. Após misturar a enzima e o substrato, ejectam-se as pontas e coloca-se um novo conjunto de pontas no dispositivo de pipetagem de transferência para a coluna seguinte. Um temporizador é reiniciado, e no instante (t)=0:30, repete-se este processo para a coluna 2. No intervalo de 30 segundos seguinte (t)=1:00, repete-se este processo para a coluna 3. Repete-se este processo da esquerda para a direita através da placa, a cada 30 segundos até todos os poços conterem e enzima e substrato.

Paragem da reacção: Quando o temporizador atinge 6 minutos (t)=6:00, pipetam-se para cada poço 240 µL da solução de trabalho de soro, utilizando uma pipeta de transferência de 8 canais de 50-300 µL, para a coluna 1 da placa de fundo plano de 96 poços a partir do reservatório de reagente de 50 mL adjacente. A mistura é aspirada 3 vezes (puxando a solução para cima e para baixo com o dispositivo de pipetagem de transferência) durante os primeiros 10 segundos para assegurar a mistura completa. O processo é repetido a cada 30 segundos, prosseguindo da coluna 1 para a 12. Após a última coluna (coluna 12) estar completa, remove-se a placa reaccional do bloco de aquecimento e coloca-se a placa sobre o tabuleiro de leitura do leitor de placas a 640 nm. A partir da curva de calibração é gerada uma curva de ajustamento linear que permite a extrapolação de amostras de teste.

ENSAIOS ALTERNATIVOS PARA HIALURONIDASE

ENSAIO DE MICROTITULAÇÃO DE HIALURONANO BIOTINILADO

Os grupos carboxilo livres nos resíduos ácido glucurónico de hialuronano são biotinilados num passo de reacção utilizando biotina-hidrazida (Pierce), sulfo-NHS (Pierce) e 1-etil-dimetilaminopropil-carbodi-imida (Sigma). Este substrato de HA biotinilado é acoplado covalentemente a uma placa de microtitulação de 96 poços numa segunda reacção. Após a reacção enzimática estar completa, o substrato residual é detectado com uma reacção de avidina-peroxidase que pode ser lida num leitor de placas ELISA padrão. Como o substrato está ligado covalentemente à placa de microtitulação, não ocorrem artefactos tais como deslocamento dependente do pH do substrato biotinilado. A sensibilidade permite a medição rápida da actividade de hialuronidase a partir de células cultivadas e de amostras biológicas com uma variação inter-ensaios inferior a 10%.

A actividade específica de hialuronidase é expressa em unidades de redução da turvação (TRU, *turbidity reducing units*). Uma TRU é definida como a quantidade de actividade de hialuronidase requerida para reduzir a turvação de uma solução acidificada de ácido hialurónico e é equivalente às unidades U.S.P./National Formulary (NF XIII) (NFU). O ensaio enzimático

do tipo ELISA utilizado para purificação é relacionado com as unidades TRU, NFU e U.S.P. através de uma curva de calibração de uma amostra de hialuronidase (*e.g.*, USP) normalizada através da U.S.P. Deste modo, as actividades de enzima determinadas pelo ensaio enzimático do tipo ELISA são realmente TRU relativas, uma vez que a actividade enzimática não é realmente medida utilizando o ensaio turbidométrico (Dorfman *et al.*, 1948, J. Biol. Chem. 172:367).

Muitos ensaios de hialuronidase têm sido baseados na medição da geração de novos grupos N-acetilamino redutores (Bonner e Cantey, Clin. Chim. Acta 13:746-752, 1966), ou da perda de viscosidade (De Salegui *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 121:548-554, 1967) ou turvação (Dorfman e Ott, J. Biol. Chem. 172:367, 1948). Com substratos purificados todos estes métodos são suficientes para determinação da presença ou ausência de actividade endoglucosamídica.

Substratos de glicosaminoglicano substancialmente purificados podem também ser utilizados para um ensaio de desvio em gel. Misturam-se glicosaminoglicanos com sHASEGP recombinante para testar a actividade de endoglucosidase que resulta num desvio na mobilidade do substrato no gel. Sulfato de condroitina-4 e 6, sulfato de dermatano, sulfato de heparano podem ser obtidos na Sigma Chemical. Hialuronano de cordão umbilical humano pode ser obtido na ICN. Cada substrato de teste é diluído até 0,1 mg/ml num intervalo tampão de pH 3,5-7,5. Amostras de 10 µl de sHASEGP purificada ou também de meios condicionados a partir de células expressando sHASEGP são misturadas com 90 µl de substrato de teste em tampão desejado e incubadas durante 3 horas a 37ºC. Após incubação neutralizam-se as amostras com tampão de amostra (Tris EDTA pH 8,0, azul de bromofenol e glicerol) seguindo-se electroforese. Os glicosaminoglicanos são detectados por coloração dos géis em Azul de Alciano a 0,5% em ácido acético glacial a 3% de um dia para o outro seguindo-se descoloração em ácido acético glacial a 7%. A degradação é determinada por comparação da mobilidade do substrato na presença e na ausência de enzima.

A actividade de hialuronidase pode também ser detectada por zimografia em gel de substrato (Guentenhoner *et al.*, 1992, Matrix 388-396). Neste ensaio, uma amostra é aplicada a um gel

SDS-PAGE contendo ácido hialurónico e as proteínas na amostra são separadas por electroforese. O gel é depois incubado num tampão de ensaio de enzima e subsequentemente corado para detectar o ácido hialurónico no gel. A actividade de hialuronidase é visualizada como uma zona limpa no gel de substrato.

D. IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE GENES DE POLIPÉPTIDO DE sHASEGP.

O gene de polipéptido de sHASEGP, e/ou seus domínios, pode ser obtidos por métodos bem conhecidos na especialidade para isolamento de ADN. Pode ser utilizado qualquer método conhecido dos peritos na especialidade para identificação de ácidos nucleicos que codificam os genes desejados. Pode ser utilizado qualquer método disponível na especialidade para obter um ADNc a todo o comprimento (*i.e.*, abrangendo toda a região de codificação) ou um clone de ADN genómico codificando um polipéptido de sHASEGP. Por exemplo, a reacção em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada para amplificar uma sequência que é expressa em tecidos normais, *e.g.*, ácidos nucleicos codificando um polipéptido de sHASEGP (SEQ ID NO:1 e 2), numa biblioteca genómica ou de ADNc. Iniciadores de oligonucleótido que hibridam com sequências nos terminais 3' e 5' das sequências identificadas podem ser utilizados como iniciadores para amplificar por PCR sequências a partir de uma amostra de ácido nucleico (ARN ou ADN, geralmente uma biblioteca de ADNc) a partir de uma fonte apropriada (*e.g.* testículos, próstata, mama).

A PCR pode ser realizada, *e.g.*, pela utilização de um ciclador térmico Perkin-Elmer Cetus e polimerase Taq (Gene Amp). O ADN a ser amplificado pode incluir ARNm ou ADNc ou ADN genómico a partir de qualquer espécie eucariota. Pode-se optar por sintetizar vários iniciadores degenerados diferentes, para utilização nas reacções de PCR.

É também possível variar o rigor das condições de hibridação utilizadas na iniciação das reacções de PCR, para amplificar homólogos de ácido nucleico (*e.g.*, para obter sequências de polipéptido de sHASEGP a partir de outras espécies que não os humanos ou para obter sequências humanas com

homologia com o polipéptido de sHASEGP) permitindo maiores ou menores graus de similaridade de sequência de nucleótidos entre a sequência de nucleótidos conhecida e o homólogo de ácido nucleico que está a ser isolado. Para hibridação de espécies cruzadas, são utilizadas condições de rigor baixo a rigor moderado. Para hibridação da mesma espécie, são utilizadas condições moderadamente rigorosas a altamente rigorosas. As condições podem ser determinadas empiricamente.

Após amplificação bem sucedida do ácido nucleico contendo a totalidade ou uma porção da sequência de polipéptido de sHASEGP identificada ou de um ácido nucleico codificando a totalidade ou uma porção de um homólogo de polipéptido de sHASEGP, esse segmento pode ser clonado molecularmente e sequenciado, e utilizado como uma sonda para isolar um ADNc completo ou um clone genómico. Por sua vez, isto permite a determinação da sequência de nucleótidos completa do gene, a análise da sua expressão e a produção do seu produto de proteína para análise funcional. Uma vez determinada a sequência de nucleótidos, uma grelha de leitura aberta (*open reading frame*) codificando o produto de proteína do gene do polipéptido de sHASEGP pode ser determinada por qualquer método bem conhecido na especialidade para determinação de grelhas de leitura aberta, por exemplo, utilizando programas de computador disponíveis ao público para análise de sequências de nucleótidos. Uma vez definida uma grelha de leitura aberta, é rotina determinar a sequência de aminoácidos da proteína codificada pela grelha de leitura aberta. Deste modo, podem ser identificadas as sequências de nucleótidos dos genes de polipéptido de sHASEGP inteiros bem como as sequências de aminoácidos de proteínas e análogos de polipéptido de sHASEGP.

Qualquer célula eucariota pode servir potencialmente como a fonte de ácido nucleico para a clonagem molecular do gene de polipéptido de sHASEGP. Os ácidos nucleicos podem ser isolados a partir de vertebrado, mamífero, humano, porcino, bovino, felino, ave, equino, canino, bem como fontes adicionais de primata, insectos, plantas e outros organismos. O ADN pode ser obtido por procedimentos padrão conhecidos na especialidade a partir de ADN clonado (*e.g.*, uma "biblioteca" de ADN), por síntese química, por clonagem de ADNc, ou pela clonagem de ADN genómico, ou seus fragmentos, purificado a partir da fonte

celular desejada (ver, *e.g.*, Sambrook *et al.* 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D. M. Ed., 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. 1, 11. Clones derivados de ADN genómico podem conter regiões reguladoras e de ADN de intrão para além das regiões de codificação; clones derivados de ADNc conterão apenas sequências de exão. Para qualquer fonte, o gene é clonado num vector adequado para a sua propagação.

Na clonagem molecular do gene a partir de ADN genómico, são gerados fragmentos de ADN, alguns dos quais codificarão o gene desejado.

O ADN pode ser clivado em locais específicos utilizando várias enzimas de restrição.

Alternativamente, pode-se utilizar ADNase na presença de manganês para fragmentar o ADN, ou o ADN pode ser cortado fisicamente, por exemplo, por tratamento com ultra-sons. Os fragmentos de ADN lineares podem depois ser separados de acordo com o tamanho por técnicas padrão incluindo, mas não limitadas a, electroforese em gel de agarose e poliacrilamida e cromatografia em coluna.

Uma vez gerados os fragmentos de ADN, a identificação do fragmento de ADN específico contendo o gene desejado pode ser efectuada de várias formas.

Por exemplo, uma porção do gene de polipéptido de sHASEGP (de qualquer espécie) (*e.g.*, um produto de amplificação por PCR obtido como descrito acima ou um oligonucleótido possuindo uma sequência de uma porção da sequência de nucleótidos conhecida) ou o seu ARN específico, ou um seu fragmento purificado e marcado, e os fragmentos de ADN gerados podem ser rastreados por hibridação de ácido nucleico com a sonda marcada (Benton e Davis, Science 196: 180 (1977); Grunstein e Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3961 (1975)). Os fragmentos de ADN com homologia substancial com a sonda hibridarão. É também possível identificar o fragmento apropriado por digestão com enzima(s) de restrição e comparação dos tamanhos dos fragmentos com os esperados de acordo com um mapa de restrição conhecido, se este

estiver disponível, ou por análise da sequência de ADN e comparação com a sequência de nucleótidos conhecida do polipéptido de sHASEGP. A selecção adicional pode ser realizada com base nas propriedades do gene. Alternativamente, a presença do gene pode ser detectada por ensaios baseados nas propriedades físicas, químicas ou imunológicas do seu produto expresso. Por exemplo, podem ser seleccionados clones de ADNc, ou clones de ADN que por hibridação seleccionam o ARNm apropriado, que produzem uma proteína que, *e.g.*, tem migração electroforética, comportamento de focagem isoeléctrica, mapas de digestão proteolítica, propriedades antigénicas, actividade de hialuronidase, similares ou idênticos. Se estiver disponível um anticorpo anti-polipéptido de sHASEGP, a proteína pode ser identificada por ligação de anticorpo marcado aos clones sintetizando putativamente polipéptido de sHASEGP, num procedimento do tipo ELISA (ensaio de imunossorvente ligado a enzima).

Alternativas ao isolamento do ADN genómico do polipéptido de sHASEGP incluem, mas não estão limitadas a, síntese química da sequência génica partir de uma sequência conhecida ou preparação do ADNc para o ARNm que codifica o polipéptido de sHASEGP.

Por exemplo, ARN para clonagem de ADNc do gene de polipéptido de sHASEGP pode ser isolado a partir de células expressando a proteína. Os ácidos nucleicos identificados e isolados podem depois ser inseridos num vector de clonagem apropriado. Pode ser utilizado um grande número de sistemas vector-hospedeiro conhecidos na especialidade. Vectores possíveis incluem, mas não estão limitadas a, plasmídeos ou vírus modificados, mas o sistema de vector tem de ser compatível com a célula hospedeira utilizada. Estes vectores incluem, mas não estão limitadas a, bacteriófagos tais como derivados lambda, ou plasmídeos tais como derivados de plasmídeo pBR322 ou pUC ou o vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). A inserção num vector de clonagem, por exemplo, pode ser efectuada por ligação do fragmento de ADN num vector de clonagem que possui terminais coesos complementares.

Se os locais de restrição complementares utilizados para fragmentar o ADN não estiverem presentes no vector de clonagem,

as extremidades das moléculas de ADN podem ser modificadas enzimaticamente. Alternativamente, qualquer local desejado pode ser produzido por ligação de sequências de nucleótidos (ligantes) nos terminais de ADN; estes ligantes ligados podem incluir oligonucleótidos específicos sintetizados quimicamente codificando sequências de reconhecimento de endonuclease de restrição. Num método alternativo, o vector clivado e o gene de polipéptido de sHASEGP podem ser modificados por terminação homopolimérica.

Moléculas recombinantes podem ser introduzidas em células hospedeiras através de transformação, transfecção, infecção, electroporação, precipitação de cálcio e outros métodos, de modo a gerar muitas cópias da sequência génica.

Em concretizações específicas, a transformação de células hospedeiras com moléculas de ADN recombinante que incorporam o gene de polipéptido de sHASEGP isolado, ADNc ou uma sequência de ADN sintetizada permite a geração de múltiplas cópias do gene.

Assim, o gene pode ser obtido em grandes quantidades por cultura de transformantes, isolamento das moléculas de ADN recombinante a partir dos transformantes e, quando necessário, recuperação do gene inserido a partir do ADN recombinante isolado.

E. VECTORES, PLASMÍDEOS E CÉLULAS QUE CONTÊM ÁCIDOS NUCLEICOS CODIFICANDO UM POLIPÉPTIDO DE sHASEGP OU UM SEU DOMÍNIO DE HIALURONIDASE E EXPRESSÃO DE VECTORES DE POLIPÉPTIDOS DE sHASEGP E CÉLULAS.

Para expressão recombinante de um ou mais dos polipéptidos de sHASEGP, o ácido nucleico contendo a totalidade ou uma porção da sequência de nucleótidos codificando o polipéptido de sHASEGP pode ser inserido num vector de expressão apropriado *i.e.*, um vector que contém os elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência de codificação de proteína inserida. Os sinais de transcrição e tradução necessários podem também ser fornecidos pelo promotor nativo para genes de sHASEGP, e/ou suas regiões de flanqueamento.

São também proporcionados vectores que contêm ácido nucleico codificando as sHASEGP que podem ser introduzidos num sistema de expressão capaz de produzir uma sHASEGP activa em meio neutro solúvel.

São também proporcionadas células contendo os vectores. As células incluem células eucariotas e procariotas, e os vectores adequados para utilização nestas células.

São proporcionadas células eucariotas, incluindo células de Ovário de *Hamster* Chinês deficientes em di-hidrofolato-redutase (DG44), contendo os vectores. Células adequadas incluem células de levedura, células fúngicas, células de planta, células de insecto e células de animal. As células são utilizadas para produzir um polipéptido de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase por (a) cultura das células acima descritas sob condições nas quais o polipéptido de sHASEGP codificado ou domínio de hialuronidase do polipéptido de sHASEGP é expresso pela célula, e depois (b) recuperação da proteína do domínio de hialuronidase expressa. Nas concretizações exemplificadas, o domínio de hialuronidase é segregado para o meio.

Numa concretização, são proporcionados vectores que incluem uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido que tem actividade de hialuronidase e contém a totalidade ou apenas uma porção do domínio de hialuronidase, ou múltiplas suas cópias, de uma proteína sHASEGP. São também proporcionados vectores que compreendem uma sequência de nucleótidos que codifica o domínio de hialuronidase e porções adicionais de uma proteína sHASEGP até e incluindo uma proteína sHASEGP a todo o comprimento, bem como suas múltiplas cópias. Os vectores podem ser seleccionados para expressão da proteína sHASEGP ou seu domínio de hialuronidase na célula de modo a que a proteína sHASEGP seja expressa como uma proteína segregada. Alternativamente, os vectores podem incluir sinais necessários para secreção de proteínas codificadas. Quando o domínio de hialuronidase é expresso, o ácido nucleico está ligado a ácido nucleico codificando um sinal de secreção, tal como a sequência de sinal do factor de acasalamento (*mating*) de *Saccharomyces cerevisiae* ou uma sua porção, ou a sequência de sinal nativa.

De modo a gerar uma sHASEGP activa em meio neutro, solúvel, são requeridas células capazes de introduzir glicosilação ligada a N. Na concretização preferida, células de mamífero de Ovário de *Hamster* Chinês deficientes em di-hidrofolato-redutase, tais como DG44, são submetidas a electroporação com um plasmídeo codificando um promotor de mamífero forte, tal como o de CMV, ácido nucleico codificando uma sHASEGP seguido por um local de entrada ribossómico interno, o gene de di-hidrofolato-redutase de ratinho e a sequência de poliadenilação de SV40 como se mostra na SEQ ID NO:51. Estas células são depois cultivadas em meio definido quimicamente na ausência de hipoxantina e timidina, seguindo-se amplificação posterior do gene com concentrações crescentes de metotrexato.

Vários sistemas hospedeiro-vector podem ser utilizados para expressar a sequência de codificação de proteína. Estes incluem mas não estão limitados a sistemas de células de mamífero infectadas com vírus *e.g.* vírus vacínia, adenovírus, etc.); sistemas de células de insecto infectadas com vírus (*e.g.* baculovírus); microrganismos tais como levedura contendo vectores de levedura; ou bactérias transformadas com bacteriófago, ADN, ADN de plasmídeo ou ADN de cosmídeo. Os elementos de expressão de vectores variam nas suas forças e especificidades. Dependendo do sistema hospedeiro-vector utilizado, pode ser utilizado qualquer um de vários elementos de transcrição e tradução adequados. Note-se que a expressão bacteriana de ADN de sHASEGP não resultará *per se* numa sHASEGP cataliticamente activa mas, quando combinado com maquinaria de glicosilação apropriada, pode ser glicosilado artificialmente como tal.

Quaisquer métodos conhecidos dos peritos na especialidade para a inserção de fragmentos de ácido nucleico num vector podem ser utilizados para construir vectores de expressão contendo um gene quimérico contendo sinais de controlo de transcrição/tradução apropriados e sequências de codificação de proteína. Estes métodos podem incluir técnicas *in vitro* de ADN recombinante e sintético e recombinantes *in vivo* (recombinação genética). A expressão de sequências de ácido nucleico codificando polipéptido de sHASEGP, ou seus domínios, derivados, fragmentos ou homólogos, pode ser regulada por uma segunda sequência de ácido nucleico pelo que os genes ou seus

fragmentos são expressos num hospedeiro transformado com a(s) molécula(s) de ADN recombinante. Por exemplo, a expressão das proteínas pode ser controlada por qualquer promotor/potenciador conhecido na especialidade. Numa concretização específica, o promotor não é nativo em relação aos genes para o polipéptido de sHASEGP. Promotores que podem ser utilizados incluem, mas não estão limitadas a, o promotor precoce de SV40 (Bernoist e Chambon, Nature 290: 304-310 (1981)); o promotor contido na repetição de terminal longo 3' do vírus de sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, Cell 22: 787-797 (1980)); o promotor de timidina-quinase de herpes (Wagner *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981)); as sequências reguladoras do gene de metalotioneína (Brinster *et al.*, Nature 296: 39-42 (1982)); vectores de expressão procariota tais como o promotor de -lactamase (Villa-Kamaroff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731 1978)) ou o promotor TAC (Deboer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983)); ver também "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": em Scientific American 242: 79-94 (1980); vectores de expressão de planta contendo o promotor sintetase opalino (Herrar-Estrella *et al.*, Nature 303: 209-213 (1984)) ou o promotor de ARN de vírus do mosaico de couve-flor 35S (Garder *et al.*, Nucleic Acids RES. 9: 2871 (1981)), e o promotor da enzima fotossintética ribulose-bisfosfato-carboxilase (Herrera-Estrella *et al.*, Nature 310: 115-120 (1984)); elementos de promotor a partir de levedura e outros fungos tais como o promotor Gal4, o promotor de álcool-desidrogenase, o promotor de fosfoglicerol-quinase, o promotor de fosfatase alcalina, e as regiões de controlo de transcrição de animal seguintes que exibem especificidade de tecido e têm sido utilizadas em animais transgénicos: região de controlo do gene de elastase I que é activa em 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)); região de controlo do gene de insulina que é activa em células beta pancreáticas (Hanahan *et al.*, Nature 315: 115-122 (1985)); região de controlo do gene de imunoglobulina que é activa em células linfóides (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)); região de controlo do vírus de tumor mamário de ratinho que é activa em células testiculares, mamárias, linfóides e mastócitos (Leder *et al.*, Cell 45: 485-495 (1986)); região de

controlo do gene de albumina que é activa no fígado (Pinckert *et al.*, Genes and Devel. 1: 268- 276 (1987)); região de controlo do gene de alfa-fetoproteína que é activa no fígado (Krumlauf *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648 (1985); Hammer *et al.*, Science 235: 53-58 (1987)); região de controlo do gene de antitripsina alfa-1 que é activa no fígado (Kelsey *et al.*, Genes and Devel. 1: 161-171 (1987)); região de controlo do gene de beta globina que é activa em células mielóides (Mogram *et al.*, Nature 315: 338-340 (1985); Kollias *et al.*, Cell 46: 89-94 (1986)); região de controlo do gene de proteína básica mielina que é activa em células oligodendrocíticas do cérebro (Readhead *et al.*, Cell 48: 703-712 (1987)); região de controlo do gene da cadeia leve-2 de miosina que é activa em músculo esquelético (Sani, Nature 314: 283-286 (1985)); e a região de controlo do gene de hormona de libertação gonadotrófica que é activa em gonadotrofos do hipotálamo (Mason *et al.*, Science 234: 1372-1378 (1986)).

Numa concretização específica, é utilizado um vector que contém um promotor ligado operativamente a ácidos nucleicos codificando um polipéptido de sHASEGP, ou um seu domínio, fragmento, derivado ou homólogo, uma ou mais origens de replicação e, opcionalmente, um ou mais marcadores seleccionáveis (*e.g.*, um gene de resistência a antibiótico).

Podem também ser requeridos sinais de iniciação específicos para tradução eficiente de uma sequência de sHASEGP. Estes sinais incluem o codão de iniciação ATG e sequências adjacentes. Em casos onde sHASEGP, o seu codão de iniciação e sequências a montante são inseridos no vector de expressão apropriado, podem não ser necessários quaisquer sinais de controlo de tradução adicionais. No entanto, em casos onde apenas é inserida a sequência de codificação, ou uma sua porção, têm de ser proporcionados sinais de controlo de transcrição exógenos, incluindo o codão de iniciação ATG. Além disso, o codão de iniciação tem de estar na grelha de leitura correcta para assegurar a transcrição de toda a inserção. Elementos de transcrição exógenos e codões de iniciação podem ser de várias origens, tanto naturais como sintéticos. A eficiência de expressão pode ser melhorada pela inclusão de potenciadores apropriados para o sistema celular em utilização (Scharf D. *et*

al. (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-62; Bittner *et al.* (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544).

Adicionalmente, uma estirpe de célula hospedeira pode ser escolhida pela sua capacidade para modular a expressão das sequências inseridas ou para processar a proteína expressa do modo desejado. Estas modificações do polipéptido incluem, mas não estão limitadas a, acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação e acilação. O processamento pós-tradução que cliva uma forma "pré-pró" da proteína pode também ser importante para inserção, dobragem e/ou função correctas. Diferentes células hospedeiras tais como CHO (DG44, DXB 11, CHO-K1), HeLa, MDCK, 293, WI38, etc. têm maquinaria celular específica e mecanismos característicos para estas actividades pós-tradução e podem ser escolhidas para assegurar a modificação e o processamento correctos da proteína estranha introduzida.

Para produção de proteínas recombinantes a longo prazo, com elevado rendimento, prefere-se a expressão estável. Por exemplo, linhas de células que expressam sHASEGP de modo estável podem ser transformadas utilizando vectores de expressão que contêm origens de replicação virais ou elementos de expressão endógenos e um gene de marcador seleccionável. Após a introdução do vector, podem-se deixar as células crescer durante 1-2 dias num meio enriquecido antes de serem transferidas para meio selectivo. O propósito do marcador seleccionável é conferir resistência à selecção, e a sua presença permite o crescimento e a recuperação de células que expressam com sucesso as sequências introduzidas. Colónias resistentes de células transformadas de modo estável podem ser multiplicadas utilizando técnicas de cultura de tecidos apropriadas para o tipo de célula.

Podem ser utilizados vários sistemas de selecção para recuperar linhas de células transformadas. Estes incluem mas não estão limitadas aos genes de timidina-quinase (Wigler M. *et al.* (1977) Cell 11:223-32) e de adenina-fosforribosiltransferase (Lowy I. *et al.* (1980) Cell 22:817-23) de vírus herpes *simplex* que podem ser utilizados em células TK^- ou células $APRT^-$, respectivamente. Também, a resistência a antimetabolito, antibiótico ou herbicida pode ser utilizada como a base para selecção; por exemplo, DHFR que confere

resistência a metotrexato (Wigler M. *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-70); npt, que confere resistência aos aminoglicósidos neomicina e G-418 (Colbere-Garapin F. *et al.* (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14) e als ou pat, que conferem resistência a clorsulfuron e fosfinotricina-acetiltransferase, respectivamente (Murry, *supra*). Têm sido descritos genes seleccionáveis adicionais, por exemplo, trpB, que permite às células utilizar indole em vez de triptofano, ou hisD, que permite às células utilizar histinol em vez de histidina (Hartman S. C. e R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-51). Recentemente, a utilização de marcadores visíveis tem ganho popularidade, com marcadores tais como antocianinas, beta-glucuronidase e o seu substrato, GUS, e luciferase e o seu substrato, luciferina, sendo amplamente utilizados não apenas para identificar transformantes, mas também para quantificar a quantidade de expressão de proteína estável ou transiente atribuível a um sistema de vector específico (Rhodes C. A. *et al.* (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131).

IDENTIFICAÇÃO DE TRANSFORMANTES CONTENDO A SEQUÊNCIA POLINUCLEOTÍDICA

Ainda que a presença/ausência de expressão de um gene marcador sugira que o gene de interesse está também presente, a presença de expressão de uma sHASEGP activa deverá ser confirmada. Por exemplo, se a sHASEGP está inserida numa sequência de gene marcador, células recombinantes contendo sHASEGP podem ser identificadas pela ausência de função do gene marcador. Alternativamente, um gene marcador pode ser colocado em tandem com uma sequência de sHASEGP sob o controlo de um único promotor. A expressão do gene marcador em resposta a indução ou selecção indica usualmente expressão também da sHASEGP em tandem. A detecção de uma sHASEGP activa em meio neutro correctamente glicosilada pode ser determinada através de teste do meio condicionado quanto à actividade enzimática de sHASEGP sob condições apropriadas.

PURIFICAÇÃO DE sHASEGP

Células hospedeiras transformadas com uma sequência de nucleótidos de sHASEGP podem ser cultivadas sob condições adequadas para a expressão e recuperação da proteína codificada

a partir da cultura de células. A proteína produzida por uma célula recombinante é preferivelmente segregada mas pode ficar contida intracelularmente dependendo da sequência e/ou do vector utilizado. Como será reconhecido pelos peritos na especialidade, vectores de expressão contendo sHASEGP podem ser desenhados com sequências de sinal que facilitam a secreção directa de sHASEGP através de uma membrana celular procariota ou eucariota. Outras construções recombinantes podem unir a sHASEGP a uma sequência de nucleótidos codificando um domínio polipeptídicos o que facilitará a purificação de proteínas solúveis (Kroll D. J. *et al.* (1993) DNA Cell Biol. 12:441-53; *cf* discussão de vectores *infra* contendo proteínas de fusão).

A sHASEGP pode também ser expressa como uma proteína recombinante com um ou mais domínios polipeptídicos adicionais acrescentados para facilitar a purificação da proteína. Estes domínios facilitadores da purificação incluem, mas não estão limitadas a, péptidos quelantes de metal tais como módulos de histidina-triptofano que permitem a purificação sobre metais imobilizados, domínios de proteína A que permitem a purificação sobre imunoglobulina imobilizada, e o domínio utilizado no sistema de extensão/purificação por afinidade FLAGS (Immunex Corp, Seattle Wash.). A inclusão de uma sequência de ligante clivável tal como Factor XA ou enteroquinase (Invitrogen, San Diego Calif.) entre o domínio de purificação e sHASEGP é útil para facilitar a purificação. Um tal vector de expressão proporciona a expressão de uma proteína de fusão comprometendo uma sHASEGP e contém ácido nucleico codificando 6 resíduos histidina seguidos por tiorredoxina e um local de clivagem de enteroquinase. Os resíduos histidina facilitam a purificação em IMIAC (cromatografia de afinidade por ião metálico imobilizado, como descrito em Porath *et al.* (1992) Protein Expression and Purification 3: 263-281) enquanto o local de clivagem de enteroquinase proporciona meios para purificação da quimioquina a partir da proteína de fusão.

Para além da produção recombinante, fragmentos de sHASEGP podem ser produzidos por síntese peptídica directa utilizando técnicas de fase sólida (*cf* Stewart *et al.* (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco; Merrifield J. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154). A síntese de proteínas *in vitro* pode ser realizada utilizando técnicas

manuais ou por automação. A síntese automatizada pode ser conseguida, por exemplo, utilizando um Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City Calif.) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Vários fragmentos de sHASEGP podem ser sintetizados quimicamente em separado e combinados utilizando métodos químicos para produzir a molécula a todo o comprimento.

Vectores de expressão contendo as sequências de codificação, ou suas porções, de um polipéptido de sHASEGP, são preparados, por exemplo, por subclonagem das porções de codificação no local de restrição EcoR1 de cada um dos três vectores PGEX (vectores de expressão de glutationa-S-transferase (Smith e Johnson, Gene 7: 31-40 (1988)). Isto permite a expressão de produtos na grelha de leitura correcta. Exemplos de vectores e sistemas para expressão dos domínios de hialuronidase dos polipéptidos de sHASEGP incluem os vectores de *Pichia* bem conhecidos (disponíveis, por exemplo, na Invitrogen, San Diego, CA), particularmente aqueles desenhados para secreção das proteínas codificadas. A proteína pode também ser expressa citoplasmaticamente, tal como nos corpos de inclusão. Um vector exemplar é descrito nos exemplos.

Plasmídeos para transformação de células de *E. coli*, incluem, por exemplo, os vectores de expressão pET (ver, Patente U.S. 4952496; disponível na Novagen, Madison, WI; ver também literatura publicada pela Novagen descrevendo o sistema).

Estes plasmídeos incluem pET11a, que contém o promotor lac de T7, o terminador de T7, o operador lac indutível de *E. coli*, o gene repressor lac; pET12a-c, que contém o promotor de T7, o terminador de T7 e o sinal de secreção de ompT de *E. coli*; e pET15B e pET19B (Novagen, Madison, Wi), que contêm uma sequência de comando His-Tag para utilização na purificação com uma coluna de His e um local de clivagem de trombina que permite a clivagem após purificação através da coluna; a região de promotor lac de T7 e o terminador de T7.

Os vectores são introduzidos em células hospedeiras, tais como células *Pichia* e células bacterianas, tais como *E. coli*, e as proteínas aí expressas. Estirpes de *Pichia* exemplares incluem, por exemplo, GS115. Hospedeiros bacterianos exemplares

contêm cópias cromossómicas de ADN codificando ARN-polimerase de T7 ligado operativamente a um promotor indutível, tal como o promotor lacUV (ver, Patente U.S. N.º 4952496). Estes hospedeiros incluem, mas não estão limitados a, a estirpe de *E. coli* lisogénica BL21 (DE3).

Os domínios, derivados e análogos de sHASEGP podem ser produzidos por vários métodos conhecidos na especialidade. Por exemplo, uma vez identificada uma célula recombinante expressando um polipéptido de sHASEGP, ou um seu domínio, fragmento ou derivado, o produto génico individual pode ser isolado e analisado. Isto é efectuado por ensaios baseados nas propriedades físicas e/ou funcionais da proteína, incluindo, mas não limitados a, marcação radioactiva do produto seguida por análise por electroforese em gel, imunoensaio, ligação cruzada a marcador-produto marcado, e ensaios de actividade proteolítica.

Os polipéptidos de sHASEGP podem ser isolados e purificados por métodos padrão conhecidos na especialidade (quer a partir de fontes naturais quer a partir de células hospedeiras recombinantes expressando os complexos ou proteínas), incluindo mas não restringidos a cromatografia em coluna (*e.g.*, permuta iónica, afinidade, exclusão em gel, alta pressão de fase reversa e líquida de proteína rápida), centrifugação diferencial, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica padrão utilizada para a purificação de proteínas.

Numa concretização, uma sHASEGP pode ser purificada até à homogeneidade a partir do meio condicionado definido quimicamente de células DG44 transfectadas com HZ24 e amplificadas por metotrexato por 1) diafiltração de fluxo tangencial, 2) ligação e eluição a partir de cromatografia de permuta aniónica, 3) fluxo através de cromatografia de Phenyl Sepharose, 4) ligação e eluição a partir de cromatografia de fenilboronato e 4) ligação e eluição com cromatografia de hidroxiapatite.

As propriedades funcionais podem ser avaliadas utilizando qualquer ensaio adequado conhecido na especialidade.

Alternativamente, uma vez identificado um polipéptido de sHASEGP ou um seu domínio ou derivado, a sequência de aminoácidos da proteína pode ser deduzida a partir da sequência de nucleótidos do gene que o codifica. Como resultado, a proteína ou seu domínio ou derivado podem ser sintetizados por métodos químicos padrão conhecidos na especialidade (*e.g.* ver Hunkapiller *et al.*, Nature 310: 105-111 (1984)) seguindo-se glicosilação *in vitro.*

Manipulações de sequências de polipéptido de sHASEGP podem ser efectuadas ao nível da proteína. São também aqui contempladas proteínas de polipéptido de sHASEGP, seus domínios, seus derivados ou análogos ou fragmentos, que são modificados diferencialmente durante ou após a tradução, *e.g.*, por glicosilação, acetilação, fosforilação, amidação, peguilação, derivatização por grupos bloqueadores/protectores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a uma molécula de anticorpo ou a outro ligando celular.

Qualquer uma de numerosas modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas incluindo, mas não limitadas a, clivagem química específica por brometo de cianogénio, tripsina, quimotripsina, papaína, V8, $NaBH_4$, acetilação, formilação, oxidação, redução, síntese metabólica na presença de tunicamicina e de outros destes agentes.

Adicionalmente, domínios, análogos e derivados de um polipéptido de sHASEGP podem ser sintetizados quimicamente. Por exemplo, um péptido correspondendo a uma porção de um polipéptido de sHASEGP, que inclui o domínio desejado ou que medeia a actividade desejada *in vitro*, pode ser sintetizado pela utilização de um sintetizador de péptidos.

Para além disso, se desejado, aminoácidos não clássicos ou análogos químicos de aminoácidos podem ser introduzidos como uma substituição ou adição na sequência de polipéptido de sHASEGP. Aminoácidos não clássicos incluem mas não estão limitados aos isómeros D dos aminoácidos comuns, ácido -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, E-ABU, e-Ahx, ácido 6-amino-hexanóico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina,

ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclo-hexilalanina, -alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos desenhados tais como -metilaminoácidos, ca-metil-aminoácidos, na-metil-aminoácidos, e análogos de aminoácido em geral. Para além disso, o aminoácido pode ser D (dextro-rotatório) ou L (levo-rotatório).

Em casos onde produtos naturais são suspeitos de serem mutantes ou são isolados a partir de novas espécies, a sequência de aminoácidos do polipéptido de sHASEGP isolado a partir da fonte natural, bem como aquelas expressas *in vitro*, ou a partir de vectores de expressão sintetizados *in vivo* ou *in vitro*, pode ser determinada a partir da análise da sequência de ADN ou, alternativamente, por sequenciação directa da proteína isolada. Esta análise pode ser realizada por sequenciação manual ou através da utilização de um sequenciador de aminoácidos automático.

Modificações - São aqui contempladas várias modificações dos polipéptidos e domínios de sHASEGP. Uma molécula de ácido nucleico codificando sHASEGP pode ser modificada por qualquer das numerosas estratégias conhecidas na especialidade (Sambrook *et al.* (1990), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). As sequências podem ser clivadas em locais apropriados com endonuclease(s) de restrição, seguindo-se modificação enzimática adicional se desejado, isoladas e ligadas *in vitro*. Na produção do gene codificando um domínio, derivado ou análogo de sHASEGP, deve-se ter cuidado em assegurar que o gene modificado mantém a grelha de leitura de tradução original, não interrompida por sinais de paragem da tradução, na região do gene onde a actividade desejada está codificada.

Adicionalmente, as moléculas de ácido nucleico codificando sHASEGP podem ser mutadas *in vitro* ou *in vivo*, para criar e/ou destruir sequências de tradução, iniciação, e/ou terminação, ou para criar variações em regiões de codificação e/ou formar novos locais de endonuclease de restrição ou destruir os preexistentes, para facilitar adicionalmente a modificação *in vitro*. Também, como aqui descrito, são contempladas muteínas com alterações na sequência primária, tais como substitutos de resíduos Cys e eliminação ou adição de locais de glicosilação;

a sHASEGP da SEQ ID NO:1 tem sete locais de glicosilação potenciais. Estas mutações podem ser efectuadas por qualquer técnica para mutagénese conhecida na especialidade, incluindo, mas não limitada a, mutagénese química e mutagénese dirigida *in vitro* (Hutchinson *et al.*, J. Biol. Chem. 253: 6551-6558 (1978)), utilização de ligantes TABE (Pharmacia). Numa concretização, por exemplo, um polipéptido de sHASEGP ou um seu domínio é modificado para incluir um marcador fluorescente. Noutras concretizações específicas, o polipéptido de sHASEGP é modificado para ter um reagente heterobifuncional; estes reagentes heterobifuncionais podem ser utilizados para reticular os membros do complexo.

Adicionalmente, podem ser sintetizados quimicamente domínios, análogos e derivados de uma sHASEGP. Por exemplo, um péptido correspondendo a uma porção de uma sHASEGP, que inclui o domínio desejado ou que medeia a actividade desejada *in vitro* pode ser sintetizado pela utilização de um sintetizador de péptidos. Para além disso, se desejado, aminoácidos não clássicos ou análogos químicos de aminoácidos podem ser introduzidos como uma substituição ou adição na sequência de sHASEGP. Aminoácidos não clássicos incluem mas não estão limitados aos isómeros D dos aminoácidos comuns, ácido -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, S-ABU, e-Ahx, ácido 6-amino-hexanóico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclo-hexilalanina, -alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos desenhados tais como -metilaminoácidos, ca-metil-aminoácidos, na-metil-aminoácidos, e análogos de aminoácido em geral. Para além disso, o aminoácido pode ser D (dextro-rotatório) ou L (levo-rotatório).

F. GERAÇÃO DE UMA sHASEGP GLICOSILADA FUNCIONALMENTE ACTIVA COM PORÇÕES AÇÚCAR LIGADAS A N.

sHASEGP humana correctamente N-glicosilada é requerida para gerar uma proteína cataliticamente estável. A glicosilação de sHASEGP ligada a N pode ser realizada através de várias técnicas. A glicosilação de sHASEGP pode ser realizada por introdução de ácidos nucleicos codificando sHASEGP em células

de origem eucariota capazes de glicosilação ligada a N apropriada ou, alternativamente, por contacto do polipéptido de sHASEGP com extractos isentos de células ou enzimas purificadas capazes de introduzirem as porções açúcar ligadas a N desejadas.

SELECÇÃO DE UM SISTEMA DE EXPRESSÃO

Os sistemas de expressão de células eucariotas variam na extensão e no tipo de glicosilação que introduzem num polipéptido expresso ectopicamente. As células CHO, por exemplo, são altamente eficientes na introdução de glicosilação ligada a N num polipéptido de sHASEGP activo.

Sistemas de expressão eucariotas adicionais que introduzem glicosilação ligada a N para gerar um produto de sHASEGP funcional podem ser testados por introdução de um plasmídeo de expressão de sHASEGP humana nas referidas células e ensaio quanto à actividade em meio neutro. A glicosilação ligada a N apropriada pode ser determinada por meio de análise FACE de oligossacáridos libertados por PNGase. São aqui ainda proporcionados perfis de glicosilação de sHASEGP cataliticamente activas. A verificação da glicosilação pode também ser efectuada por tratamento de sHASEGP a partir das referidas células com PNGase F ou por crescimento destas células em tunicamicina após introdução de ácidos nucleicos codificando sHASEGP.

N-glicosilação de polipéptido de sHASEGP *in vitro*. O polipéptido de sHASEGP pode ser N-glicosilado por contacto do polipéptido de sHASEGP com extractos isentos de células contendo actividade capaz de transferir açúcares ligados a N para o polipéptido de sHASEGP, tais como membranas microssómicas caninas, ou através de transcrição e tradução acopladas como está disponível comercialmente (Promega Madison WI).

Considera-se que os oligossacáridos têm uma extremidade redutora e uma extremidade não redutora, seja ou não o sacárido na extremidade redutora de facto um açúcar redutor. De acordo com a nomenclatura aceite, os oligossacáridos são aqui ilustrados com a extremidade não redutora à esquerda e a extremidade redutora à direita. Todos os oligossacáridos aqui descritos são descritos com o nome ou abreviatura para o

sacárido não redutor (*e.g.*, Gal), seguido pela configuração da ligação glicosídica (alfa ou beta), a ligação de anel, a posição de anel do sacárido redutor envolvido na ligação, e depois o nome ou abreviatura do sacárido redutor (*e.g.*, GlcNAc). A ligação entre dois açúcares pode ser expressa, por exemplo, como 2,3, 2.fw darw.3, ou (2,3). Cada sacárido é uma piranose.

Como aqui utilizada, porção açúcar ligada a N refere-se a um oligossacárido ligado a uma sHASEGP através do azoto de amida de resíduos Asn. Os oligossacáridos ligados a N caem em vários tipos principais (oligomanose, complexo, híbrido, sulfatado), que possuem todos núcleos (Man)3-GlcNAc-GlcNAc- ligados através do azoto de amida de resíduos Asn que se situam dentro de sequências -Asn-Xaa-Thr/Ser- (onde Xaa não é Pro). Locais ligados a N são muitas vezes atribuídos indirectamente pelo aparecimento de um ciclo em "branco" durante a sequenciação. A identificação positiva pode ser efectuada após libertação do oligossacárido por PNGase F, que converte a Asn glicosilada em Asp. Após libertação por PNGase F, os oligossacáridos ligados a N podem ser purificados utilizando cromatografia em Bio-Gel P-6, com as fracções combinadas de oligossacárido submetidas a cromatografia de permuta aniónica a pH elevado (HPAEC) preparativa (Townsend *et al.*, (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). Certos isómeros de oligossacárido podem ser resolvidos utilizando HPAEC. Resíduos fucose desviarão as posições de eluição para mais cedo no cromatograma de HPAEC, enquanto resíduos ácido siálico adicionais aumentarão o tempo de retenção. O tratamento concorrente de glicoproteínas cujas estruturas de oligossacárido são conhecidas (*e.g.*, fetuína de bovino, glicoproteína ácida a-1, ovalbumina, ARNase B, transferrina) pode facilitar a atribuição dos picos de oligossacárido. Os oligossacáridos recolhidos podem ser caracterizados por uma combinação de análises de composição e de ligações de metilação (Waeghe*et al.*, (1983) Carbohydr. Res. 123, 281-304.), com as configurações anoméricas atribuídas por espectroscopia de RMN (Van Halbeek (1993) em Methods Enzymol. 230).

Alternativamente, os oligossacáridos podem ser identificados por electroforese de carboidratos assistida por fluorescência (FACE, *fluorescence assisted carbohydrate*

electrophoresis), Callewaert *et al.* (2001) Glycobiology 11, 275-281.

G. DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PORÇÕES AÇÚCAR LIGADAS A N NA sHASEGP

Determinar se uma proteína está de facto glicosilada é o passo inicial na análise de glicano da glicoproteína. A electroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) tem-se tornado o método escolhido como o passo final antes da sequenciação de proteínas. As proteínas glicosiladas migram frequentemente como bandas difusas por SDS-PAGE. Uma diminuição acentuada na largura de banda e uma alteração na posição de migração após tratamento com péptido-N4-(N-acetil-D-glucosaminil)-asparagina-amidase (PNGase F) são considerados um diagnóstico de glicosilação ligada a N. Se os outros tipos de glicosilação são predominantes têm de ser utilizadas outras abordagens. Métodos de *blotting* de lecitina proporcionam uma abordagem que é independente da classe de glicosilação (N *versus* O). As lectinas, proteínas de ligação de carboidrato a partir de vários tecidos de plantas, têm não só afinidade elevada mas também uma especificidade estreita para uma vasta gama de epítopos de açúcar definidos encontrados em glicanos de glicoproteína (Cummings, R. D. (1994) Methods in Enzymol. 230, 66-86). Quando conjugadas com biotina ou digoxigenina, podem ser facilmente identificadas em *blots* de membrana através de uma reacção colorimétrica utilizando avidina ou anticorpos anti-digoxigenina conjugados com fosfatase alcalina (Haselbeck, *et al.* (1993) Methods in Mol. Biol. 14, 161-173), análoga a reacções de anticorpo secundário-fosfatase alcalina utilizadas em *Western blotting*. O rastreio com um painel de lectinas com especificidade bem definida pode proporcionar informação considerável acerca do complemento de carboidrato de uma glicoproteína. De modo importante, a amplificação do desenvolvimento de cor é suficientemente elevada tal que 10-50 ng de uma glicoproteína podem ser facilmente observados numa *blot* de membrana de uma SDS-PAGE. Ainda que as lectinas exibam afinidade muito elevada pelos seus ligandos cognatos, algumas revelam mesmo avidez significativa por epítopos relacionados estruturalmente. Assim, é importante atender cuidadosamente à possibilidade de reactividade cruzada quando se escolhe um painel de lectinas, e aplicar aquelas com

a probabilidade mais elevada de distinguir individualmente glicanos complexos, híbridos e de elevado teor em manose ligados a N de estruturas ligadas a O.

A análise de monossacáridos pode também ser utilizada para determinar se sHASEGP está ou não glicosilada e, como no caso da análise de lectina, proporciona informação adicional sobre características estruturais. A análise quantitativa da composição de monossacáridos i) identifica proteínas glicosiladas, ii) dá a proporção molar de açúcares individuais para proteína, iii) sugere, nalguns casos, a presença de classes de oligossacáridos, iv) é o primeiro passo no desenho de uma estratégia de elucidação estrutural, e v) proporciona uma medida da consistência de produção para terapêutica de glicoproteína recombinante. Em anos recentes, a cromatografia de permuta aniónica a pH elevado com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) tem sido extensivamente utilizada para determinar a composição de monossacáridos (Townsend, *et al.* (1995) em Carbohydrate Analysis: High-performance liquid chromatography and capillary electroforese (Z. El Rassi ed.). págs. 181-209.). Mais recentemente, têm sido introduzidos métodos de marcação baseados em fluoróforo e muitos estão disponíveis em forma de *kit*. Uma vantagem distinta dos métodos fluorescentes é um aumento em sensibilidade (50 vezes). Uma desvantagem potencial é que monossacáridos diferentes podem demonstrar selectividades diferentes pelo fluoróforo durante a reacção de acoplamento, quer no hidrolisado quer na mistura de padrão externo. No entanto, o aumento em sensibilidade e a capacidade para identificar quais os monossacáridos que estão presentes numa pequena porção da quantidade total de glicoproteína disponível, bem como o potencial para uma maior sensibilidade utilizando fluorescência induzida por laser, torna esta abordagem atractiva.

A análise da composição de monossacáridos de pequenas quantidades de sHASEGP é mais bem realizada em membranas PVDF (PSQ), quer após *electroblotting* (Weitzhandler *et al.*, (1993) J. Biol. Chem. 268, 5121-5130,) quer se se pretenderem analisar alíquotas mais pequenas em *dot-blots*. A PVDF é uma matriz ideal para análise de carboidrato uma vez que nem monossacáridos nem oligossacáridos se ligam à membrana, uma vez libertados por hidrólise quer ácida quer enzimática.

A análise FACE é um meio eficiente de detecção de perfis de glicosilação de sHASEGP. O FACE® N-Linked Oligosaccharide Profiling (Prozyme) com géis de oligossacárido a 30% é um destes mecanismos. Oligossacáridos clivados a partir de 100 µg de glicoproteínas por digestão enzimática com N-glicanase (também conhecida como PNGase), marcados utilizando o fluoróforo ANTS, e separados por electroforese, podem ser utilizados para detecção de perfis de glicosilação de sHASEGP. As posições relativas das bandas de oligossacárido são determinadas por ensaio da amostra e de diluições da amostra ao lado de uma escala padrão de oligossacárido que indica a distância de migração em unidades de Grau de Polimerização (DP, *Degree of Polymerization*).

I. MÉTODOS DE TRATAMENTO

sHASEGP identificadas pelos presentes métodos são utilizadas para tratamento ou prevenção de acumulações anormais de substratos de sHASEGP num animal, particularmente um mamífero, incluindo um humano. Numa concretização, o método inclui administrar a um mamífero uma quantidade eficaz de uma glicoproteína sHASEGP, tal que a doença ou distúrbio sejam tratados ou prevenidos.

Terapia génica. Num exemplo de concretização, ácidos nucleicos que incluem uma sequência de nucleótidos codificando um polipéptido de sHASEGP ou seus domínios funcionais ou derivados, são administrados para promover a função do polipéptido de sHASEGP, através de terapia génica. Terapia génica refere-se a terapia realizada pela administração de um ácido nucleico a um sujeito. Nesta concretização, o ácido nucleico produz a sua proteína codificada que medeia um efeito terapêutico promovendo a função do polipéptido de sHASEGP. Para terapia génica, podem ser utilizados quaisquer dos métodos disponíveis na especialidade (ver, Goldspiel *et al.*, Clinical Pharmacy 12: 488-505 (1993); Wu e Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, An. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); e Morgan e Anderson, An. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); TIBTECH 11 5: 155-215 (1993)). Por exemplo, uma composição terapêutica para terapia génica inclui um ácido nucleico codificando um

polipéptido de sHASEGP que é parte de um vector de expressão que expressa um polipéptido de sHASEGP ou seu domínio, fragmento ou proteína quimérica num hospedeiro adequado. Em particular, um tal ácido nucleico possui um promotor ligado operativamente à região de codificação do polipéptido de sHASEGP, o promotor sendo indutível ou constitutivo, e, opcionalmente, específico de tecido. Noutra concretização particular, é utilizada uma molécula de ácido nucleico na qual as sequências de codificação de polipéptido de sHASEGP e quaisquer outras sequências desejadas são flanqueadas por regiões que promovem recombinação homóloga num local desejado no genoma, proporcionando assim a expressão intracromossómica do ácido nucleico de proteína sHASEGP (Koller e Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra *et al.*, Nature 342: 435-438 (1989)).

A entrega do ácido nucleico a um paciente pode ser quer directa, caso em que o paciente é directamente exposto ao ácido nucleico ou vector transportando o ácido nucleico, quer indirecta, caso em que células são primeiro transformadas com o ácido nucleico *in vitro*, e depois transplantadas para o paciente. Estas duas abordagens são conhecidas, respectivamente, como terapia génica *in vivo* ou *ex vivo*.

Numa concretização específica, o ácido nucleico é administrado directamente *in vivo*, onde é expresso para produzir o produto codificado. Isto pode ser realizado por qualquer de numerosos métodos conhecidos na especialidade, *e.g.*, construindo este como parte de um vector de expressão de ácido nucleico apropriado e administrando este de modo a que se torne intracelular, *e.g.*, por infecção utilizando um vector retroviral, ou outro vector viral, deficiente ou atenuado (ver Patente U.S. N.º 4980286), ou por injecção directa de ADN nu, ou pela utilização de bombardeamento de micropartículas (*e.g.*, uma arma de genes; Biolistic, Dupont), ou revestimento com lípidos ou receptores da superfície celular ou agentes de transfecção, encapsulação em lipossomas, micropartículas ou microcápsulas, ou por administração deste em ligação com um péptido que é conhecido por entrar no núcleo, por administração deste em ligação com um ligando sujeito a endocitose mediada por receptor (ver *e.g.*, Wu e Wu, J. Biol. Chem, 262: 4429-4432 (1987)) (que pode ser utilizado para atingir especificamente tipos de células expressando os receptores), etc. Noutra

concretização, pode ser formado um complexo de ácido nucleico-ligando no qual o ligando é um péptido viral fusogénico para desfazer endossomas, permitindo ao ácido nucleico evitar a degradação lisossómica. Ainda noutra concretização, o ácido nucleico pode ser direccionado *in vivo* para incorporação específica e expressão em células, visando um receptor específico (ver, *e.g.*, Publicações PCT WO 92/06180 datada de 16 de Abril de 1992 (Wu *et al.*); WO 92/22635 datada de 23 de Dezembro de 1992 (Wilson *et al.*); WO 92/20316 datada de 26 de Novembro de 1992 (Findeis *et al.*); WO 93/14188 datada de 22 de Julho de 1993 (Clarke *et al.*), WO 93/20221 datada de 14 de Outubro de 1993 (Young)). Alternativamente, o ácido nucleico pode ser introduzido intracelularmente e incorporada no ADN da célula hospedeira para expressão, por recombinação homóloga (Koller e Mithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); Zijistra *et al.*, Nature 342: 435-438 (1989)).

Numa concretização específica, é utilizado um vector viral que contém o ácido nucleico de polipéptido de sHASEGP. Por exemplo, pode ser utilizado um vector retroviral (ver Miller *et al.*, Meth. Enzymol. 217: 581-599 (1993)). Estes vectores retrovirais têm sido modificados para apagar sequências retrovirais que não são necessárias para empacotamento do genoma viral e integração no ADN da célula hospedeira. O ácido nucleico de polipéptido de sHASEGP a ser utilizado em terapia génica é clonado no vector, o que facilita a entrega do gene a um paciente. Mais detalhe acerca de vectores retrovirais pode ser encontrado em Boesen *et al.*, Biotherapy 6: 291-302 (1994), que descreve a utilização de um vector retroviral para entregar o gene mdr1 a células estaminais hematopoiéticas de modo a tornar as células estaminais mais resistentes a quimioterapia.

Outras referências ilustrando a utilização de vectores retrovirais em terapia génica são: Clowes *et al.*, J. Clin. Invest. 93: 644-651 (1994); Kiem *et al.*, Blood 83: 1467-1473 (1994); Salmons e Gunzberg, Human Gene Therapy 4: 129-141 (1993); e Grossman e Wilson, Curr. Opin. In Genetics And Devel. 3: 110-114 (1993).

Os adenovírus são outros vectores virais que podem ser utilizados em terapia génica. Os adenovírus são veículos especialmente atractivos para entregar genes ao epitélio

respiratório. Os adenovírus infectam naturalmente o epitélio respiratório onde causam uma doença moderada. Outros alvos para sistemas de entrega baseados em adenovírus são fígado, o sistema nervoso central, células endoteliais e músculo. Os adenovírus têm a vantagem de serem capazes de infectar células que perderam a capacidade de se dividir. Kozarsky e Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503 (1993) apresentam uma revisão da terapia génica baseada em adenovírus. Bout *et al.*, Human Gene Therapy 5: 3-10 (1994) demonstraram a utilização de vectores de adenovírus para transferir genes para o epitélio respiratório de macacos *rhesus*. Outros casos da utilização de adenovírus em terapia génica podem ser encontrados em Rosenfeld *et al.*, Science 252: 431-434 (1991); Rosenfeld *et al.*, Cell 68: 143-155 (1992); e Mastrangeli *et al.*, J. Clin. Invest. 91: 225-234 (1993).

Vírus adeno-associados (AAV) têm também sido propostos para utilização em terapia génica (Walsh *et al.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993)).

Outra abordagem à terapia génica envolve a transferência de um gene para células em cultura de tecidos por métodos tais como electroporação, lipofecção, transfecção mediada por fosfato de cálcio ou infecção viral. Usualmente, o método de transferência inclui a transferência de um marcador seleccionável para as células. As células são depois colocadas sob selecção para isolar aquelas células que incorporaram e estão a expressar o gene transferido. Essas células são depois entregues a um paciente.

Nesta concretização, o ácido nucleico é introduzido numa célula antes da administração *in vivo* da célula recombinante resultante. Esta introdução pode ser realizada por qualquer método conhecido na especialidade, incluindo mas não limitado a transfecção, electroporação, micro-injecção, infecção com um vector viral ou de bacteriófago contendo as sequências de ácido nucleico, fusão celular, transferência génica mediada por cromossoma, transferência génica mediada por microcélulas, fusão de esferoplasto, etc. São conhecidas na especialidade e podem ser utilizadas numerosas técnicas para a introdução de genes estranhos nas células (ver *e.g.*, Loeffler e Behr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993); Cohen *et al.*, Meth. Enzymol. 217:

618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29: 69-92 (1985)), desde que as necessárias funções fisiológicas e de desenvolvimento das células recipientes não sejam interrompidas. A técnica deverá proporcionar a transferência estável do ácido nucleico para a célula, tal que o ácido nucleico seja expressável pela célula e geralmente hereditário e expressável pela sua progénie celular.

As células recombinantes resultantes podem ser entregues a um paciente por vários métodos conhecidos na especialidade. Numa concretização, são injectadas células epiteliais *e.g.*, subcutaneamente. Noutra concretização, células de pele recombinantes podem ser aplicadas como um enxerto de pele no paciente. Células sanguíneas recombinantes (*e.g.*, células estaminais ou progenitoras hematopoiéticas) podem ser administradas intravenosamente. A quantidade de células prevista para utilização depende do efeito desejado, do estado do paciente, etc., e pode ser determinada por um perito na especialidade.

Células nas quais um ácido nucleico pode ser introduzido para efeitos de terapia génica abrangem qualquer tipo de célula disponível desejado e incluem, mas não estão limitadas a, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, células de músculo, hepatócitos; células de sangue tais como linfócitos T, linfócitos B, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariócitos, granulócitos; várias células estaminais ou progenitoras, em particular células estaminais ou progenitoras hematopoiéticas, *e.g.*, tais como células estaminais obtidas a partir de medula óssea, sangue de cordão umbilical, sangue periférico, fígado fetal, e de outras fontes.

Por exemplo, uma célula utilizada para terapia génica é autóloga para o paciente. Numa concretização na qual são utilizadas células recombinantes em terapia génica, um ácido nucleico de um polipéptido de sHASEGP é introduzido nas células tal que este seja expressável pelas células ou pela sua progénie, e as células recombinantes são depois administradas *in vivo* para efeitos terapêuticos. Numa concretização específica, são utilizadas células estaminais ou progenitoras. Quaisquer células estaminais e/ou progenitoras que possam ser

isoladas e mantidas *in vitro* podem ser potencialmente utilizadas de acordo com esta concretização.

Estas células estaminais incluem mas não estão limitadas a células estaminais hematopoiéticas (HSC), células estaminais de tecidos epiteliais tais como a pele e o revestimento do intestino, células de músculo cardíaco embrionário, células estaminais de fígado (Publicação PCT WO 94/08598, datada de 28 de Abril de 1994), e células estaminais neurais (Stemple e Anderson, Cell 71: 973-985 (1992)).

Células estaminais epiteliais (ESC) ou queratinócitos podem ser obtidos a partir de tecidos tais como a pele e o revestimento do intestino por procedimentos conhecidos (Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A: 229 (1980)). Em tecido epitelial estratificado tal como a pele, a renovação ocorre por mitose de células estaminais na camada germinal, a camada mais próxima da lâmina basal. As células estaminais no revestimento do intestino proporcionam uma taxa de renovação rápida deste tecido. As ESC ou queratinócitos obtidos a partir da pele ou revestimento do intestino de um paciente ou doador podem ser cultivados em cultura de tecidos (Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A: 229 (1980); Pittelkow e Scott, Cano. Clinic Proc. 61: 771 (1986)). Se as ESC forem fornecidas por um doador, pode também ser utilizado um método para supressão da reactividade de hospedeiro *versus* enxerto (*e.g.*, irradiação, administração de fármaco ou de anticorpo para promover imunossupressão moderada).

No que se refere a células estaminais hematopoiéticas (HSC), pode ser utilizada nesta concretização qualquer técnica que proporcione o isolamento, propagação e manutenção *in vitro* de HSC. Técnicas pelas quais isto pode ser realizado incluem (a) o isolamento e estabelecimento de culturas de HSC a partir de células de medula óssea isoladas a partir do futuro hospedeiro, ou de um doador, ou (b) a utilização de culturas de HSC de longo prazo estabelecidas previamente, que podem ser alogénicas ou xenogénicas.

HSC não autólogas são geralmente utilizadas com um método de supressão de reacções imunitárias de transplantação do futuro hospedeiro/paciente. Numa concretização particular, células de

medula óssea humana podem ser obtidas a partir da crista ilíaca posterior por aspiração com agulha (ver, *e.g.*, Kodo *et al.*, J. Clin. Invest. 73: 1377-1384 (1984)). Por exemplo, as HSC podem ser produzidas em forma altamente enriquecida ou substancialmente pura. Este enriquecimento pode ser realizado antes, durante ou após cultura de longo prazo, e pode ser efectuado por quaisquer técnicas conhecidas na especialidade. Culturas de longo prazo de células de medula óssea podem ser estabelecidas e mantidas utilizando, por exemplo, técnicas de cultura de células de Dexter modificadas (Dexter *et al.*, J. Cell Physiol. 91: 335 (1977)) ou técnicas de cultura de Witlock-Witte (Witlock e Witte, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3608-3612 (1982)).

Numa concretização específica, o ácido nucleico a ser introduzido para efeitos de terapia génica inclui um promotor indutível ligado operativamente à região de codificação, de modo a que a expressão do ácido nucleico seja controlável controlando a presença ou ausência do indutor de transcrição apropriado.

3. Pró-fármacos. É proporcionado um método para tratamento de tumores. O método é praticado por administração de um pró-fármaco que é clivado num local específico por uma HASEGP para libertar um fármaco activo ou precursor que pode ser convertido no fármaco activo *in vivo*. Após contacto com uma célula que expressa actividade de sHASEGP, o pró-fármaco é convertido num fármaco activo. O pró-fármaco pode ser um conjugado que contém o agente activo, tal como um fármaco antitumoral, tal como um agente citotóxico, ou outro agente terapêutico (TA), ligado a um substrato para a sHASEGP visada, tal que o fármaco ou agente é inactivo ou incapaz de entrar numa célula, no conjugado, mas é activado após clivagem. O pró-fármaco, por exemplo, pode conter uma molécula de sulfato de condroitina, tipicamente uma relativamente curta, com menos de cerca de 20 unidades de dissacárido, que é clivada cataliticamente pela sHASEGP visada. Agentes citotóxicos incluem, mas não estão limitados a, agentes de alquilação, agentes antiproliferativos e agentes de ligação de tubulina. Outros incluem fármacos vinca, mitomicinas, bleomicinas e taxanos.

J. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MODOS DE ADMINISTRAÇÃO

1. Componentes das composições. São aqui proporcionados composições farmacêuticas contendo uma sHASEGP activa. São também proporcionadas combinações de compostos que modulam a actividade de um polipéptido de sHASEGP e outro tratamento ou composto para tratamento de um distúrbio de hialuronidase, tal como um composto de anticorpo.

O polipéptido de sHASEGP e um segundo agente podem ser embalados como composições separadas para administração conjunta ou sequencialmente ou intermitentemente. Alternativamente, podem ser fornecidos como uma única composição para administração ou como duas composições para administração como uma única composição. As combinações podem estar embaladas como *kits*.

2. Formulações e via de Administração

Os polipéptidos de sHASEGP e seu domínio de hialuronidase humana solúvel aqui proporcionados podem ser formulados como composições farmacêuticas, tipicamente para administração de dosagem única. As concentrações dos polipéptidos nas formulações são eficazes para entrega de uma quantidade, após administração, que é eficaz para o tratamento pretendido. Tipicamente, as composições são formuladas para administração de dosagem única. Para formular uma composição, a fracção em peso de um polipéptido de sHASEGP, seus domínios de hialuronidase humana solúvel ou sua mistura, é dissolvida, suspensa, dispersa ou de outro modo misturada num veículo seleccionado numa concentração eficaz tal que a condição tratada seja aliviada ou melhorada.

Transportadores ou veículos farmacêuticos adequados para administração da sHASEGP ou seus domínios de hialuronidase humana solúvel aqui proporcionados incluem qualquer daqueles transportadores conhecidos dos peritos na especialidade como adequados para o modo de administração particular.

Adicionalmente, os polipéptidos podem ser formulados como o único ingrediente farmaceuticamente activo na composição ou podem ser combinados com outros ingredientes activos. Suspensões lipossómicas, incluindo lipossomas direccionados a

tecido, podem também ser adequadas como transportadores farmaceuticamente aceitáveis. Estas podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos dos peritos na especialidade. Por exemplo, formulações de lipossomas podem ser preparadas como descrito na Patente U.S. N.º 4522811.

A sHASEGP activa ou seu domínio de hialuronidase humana solúvel é incluída no transportador farmaceuticamente aceitável numa quantidade suficiente para exercer um efeito terapeuticamente útil na ausência de efeitos secundários indesejáveis no paciente tratado. A concentração terapeuticamente eficaz pode ser determinada empiricamente por ensaio dos polipéptidos em sistemas de ensaio conhecidos *in vitro* e *in vivo* tais como utilizando os ensaios aqui proporcionados ou ver, *e.g.*, Taliani *et al.* (1996) Anal. Biochem. 240: 60-67, Filocamo *et al.* (1997) J. Virology 71: 1417-1427, Sudo *et al.* (1996) Antiviral Res. 32: 9-18, Buffard *et al.* (1995) Virology 209: 52-59, Bianchi *et al.* (1996) Anal. Biochem. 237: 239-244, Hamatake *et al.* (1996) Intervirology 39:249-258, Steinkühler *et al.* (1998) Biochem. 37:8899-8905, D'Souza *et al.* (1995) J. Gen. Virol. 76:1729-1736, Takeshita *et al.* (1997) Anal. Biochem. 247: 242-246; ver também, *e.g.*, Shimizu *et al.* (1994) J. Virol. 68: 8406-8408; Mizutani *et al.* (1996) J. Virol. 70: 7219-7223, Mizutani *et al.* (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 227: 822-826, Lu *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93: 1412-1417, Hahm *et al.* (1996) Virology 226: 318-326, Ito *et al.* (1996) J. Gen. Virol. 77: 1043-1054, Mizutani *et al.* (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 906-911, Cho *et al.* (1997) J. Viral. Meth. 65 :201-207, e depois extrapolada a partir daí para dosagens para humanos.

Tipicamente, é contemplada uma dosagem terapeuticamente eficaz. As quantidades administradas podem ser da ordem de 0,001 a 1 mg/ml, incluindo cerca de 0,005-0,05 mg/ml e cerca de 0,01 mg/ml, de volume sanguíneo. São preparadas formas de unidade de dosagem farmacêutica para proporcionar de cerca de 1 mg a cerca de 1000 mg, incluindo de cerca de 10 a cerca de 500 mg, e incluindo cerca de 25-75 mg do ingrediente activo essencial ou uma combinação de ingredientes essenciais por forma de unidade de dosagem. A dosagem precisa pode ser determinada empiricamente.

Nalguns casos, é preferível uma dose de elevadas Unidades de sHASEGP humana. Por exemplo, com administração intravenosa de sHASEGP, são preferíveis concentrações de sHASEGP de 500-100 000 Unidades por ml. Formulações liofilizadas de sHASEGP são também ideais para armazenamento de doses de grandes Unidades de sHASEGP. Para entrega intravenosa são contemplados frascos para injecção de sHASEGP liofilizada de 200 000 Unidades.

São também contempladas doses de elevada concentração para a entrega de pequenos volumes de sHASEGP. É contemplada a administração de 10-100 µl de 5000 Unidades/ml de sHASEGP para injecção na câmara anterior para dissolver substâncias viscoelásticas pré-administradas durante cirurgias de implantação de lentes intra-oculares fáquicas e das cataratas. São também contempladas injecções de pequeno volume de doses de 50-200 U/ml para procedimentos intravítreos tais como o tratamento de hemorragia vítrea ou descolamento vitro-retiniano em retinopatia diabética.

O ingrediente activo pode ser administrado de uma só vez, ou pode ser dividido em várias doses mais pequenas para serem administradas a intervalos de tempo. É entendido que a dosagem precisa e a duração de tratamento são uma função da doença que está a ser tratada e podem ser determinadas empiricamente utilizando protocolos de ensaio conhecidos ou por extrapolação a partir de resultados de ensaios *in vivo* ou *in vitro*. É de notar que as concentrações e os valores de dosagem podem também variar com a gravidade da condição a ser aliviada. Deve ainda ser entendido que, para qualquer sujeito particular, os regimes de dosagem específicos deverão ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade do indivíduo e o discernimento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições, e que as gamas de concentração aqui apresentadas são apenas exemplares e não se pretende que limitem o âmbito ou utilização das composições reivindicadas e combinações que as contêm.

Derivados farmaceuticamente aceitáveis incluem ácidos, sais, ésteres, hidratos, solvatos e formas pró-fármaco. O derivado é tipicamente seleccionado tal que as suas propriedades farmacocinéticas sejam superiores às da sHASEGP activa em meio

neutro correspondente ou seu domínio de hialuronidase humana solúvel.

Assim, concentrações ou quantidades eficazes de um ou mais dos presentes polipéptidos ou seus derivados farmaceuticamente aceitáveis são misturadas com um transportador ou veículo farmacêutico adequado para administração sistémica, tópica ou local para formar composições farmacêuticas. Polipéptidos de sHASEGP ou seus domínios de hialuronidase humana solúvel são incluídos numa quantidade eficaz para melhorar ou tratar um distúrbio para o qual o tratamento é contemplado. A concentração de polipéptido activo na composição depende das taxas de absorção, inactivação, excreção do polipéptido activo, do programa de dosagem, da quantidade administrada, da formulação particular bem como de outros factores conhecidos dos peritos na especialidade.

Os agentes terapêuticos para utilização nos métodos podem ser administrados por qualquer via conhecida dos peritos na especialidade, tal como, mas não limitada a, topicamente, intra-articularmente, intracisternalmente, intra-ocularmente, intraventricularmente, intratecalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intradermicamente, intratraquealmente, bem como por qualquer sua combinação de quaisquer duas ou mais destas. Podem também ser idealizadas formulações pulmonares de pó seco.

A via mais adequada para administração variará dependendo da utilização proposta, tal como, por exemplo, utilização como um agente de entrega para facilitar a entrega subcutânea de fluidos, utilização para reduzir a pressão intra-ocular nos olhos de pacientes de glaucoma que receberam viscoelásticos ou utilização como um "agente de disseminação" para melhorar a actividade de agentes quimioterapêuticos, e a localização de interesse, tal como um órgão interno particular, crescimento de um tumor, cavidade intra-ocular e a epiderme. Modos de administração incluem, mas não estão limitadas a, topicamente, localmente, intra-articularmente, intracisternalmente, intra-ocularmente, intraventricularmente, intratecalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intratraquealmente, intraperitonealmente, intradermicamente, e por uma combinação de quaisquer duas ou mais destas. Por exemplo, para tratamento

de vários cancros, tais como carcinoma de células escamosas, cancro da mama, cancro da bexiga urinária e cancro gastrointestinal, a administração local, incluindo administração ao local do crescimento do tumor (*e.g.*, intratecalmente, intraventricularmente ou intracisternalmente) proporciona a vantagem de o agente terapêutico poder ser administrado numa concentração elevada sem risco das complicações que podem acompanhar a administração sistémica de um agente terapêutico.

Transportadores ou veículos farmacêuticos e cosméticos adequados para administração dos polipéptidos de sHASEGP ou seu domínio de hialuronidase humana solúvel aqui proporcionados incluem quaisquer transportadores conhecidos dos peritos na especialidade como adequados para o modo particular de administração. Adicionalmente, os polipéptidos podem ser formulados como o único ingrediente farmaceuticamente activo na composição ou podem ser combinados com outros ingredientes activos que não prejudicam a acção desejada, ou com materiais que suplementam a acção desejada conhecidos dos peritos na especialidade. Por exemplo, os polipéptidos de sHASEGP aqui proporcionados podem ser utilizados como um agente de entrega ou "de disseminação" em combinação com um segundo composto activo, tal como um agente terapeuticamente eficaz, incluindo, mas não limitado a, um fármaco ou um pró-fármaco, para facilitar a entrega ou para melhorar a actividade do segundo ingrediente activo. Numa concretização particular, um polipéptido de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel pode ser co-formulado com um agente anestésico, tal como lignocaína, bupivicaína ou uma mistura dos dois, e, opcionalmente, um agente hormonal, tal como epinefrina, para diminuir ou interromper a absorção de sangue durante a cirurgia oftálmica. Um polipéptido de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel podem também ser co-formulados com vários agentes quimioterapêuticos, tais como uma toxina e um factor de necrose de tumor, para melhorar a actividade do agente quimioterapêutico e/ou a acessibilidade dos tumores alvo ao agente quimioterapêutico. O composto activo é incluído no transportador numa quantidade suficiente para exercer um efeito terapeuticamente útil na ausência de efeitos tóxicos graves no indivíduo tratado. A concentração eficaz pode ser determinada

empiricamente por ensaio dos compostos utilizando sistemas *in vitro* e *in vivo*, incluindo os modelos animais aqui descritos.

Soluções ou suspensões utilizadas para aplicação parentérica, intradérmica, subcutânea ou tópica podem incluir qualquer dos componentes seguintes: um diluente estéril, tal como água para injecção, solução salina, óleo essencial, polietilenoglicol, glicerina, propilenoglicol ou outro solvente sintético; agentes antimicrobianos, tais como álcool benzílico e metilparabenos; antioxidantes, tais como ácido ascórbico e bissulfito de sódio; agentes quelantes, tais como ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA); tampões, tais como acetatos, citratos e fosfatos; e agentes para o ajustamento de tonicidade, incluindo, mas não limitados a cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, dextrose, glicerol ou ácido bórico. Preparações parentéricas podem ser encerradas em ampolas, seringas descartáveis ou frascos para injectáveis de dose simples ou múltipla feitos de vidro, plástico ou outro material adequado.

Os polipéptidos de sHASEGP ou seus domínios de hialuronidase humana solúvel podem ser suspensos numa forma micronizada ou noutra forma adequada ou podem ser derivatizados para produzir um produto activo mais solúvel ou para produzir um pró-fármaco. A forma da mistura resultante depende de vários factores, incluindo o modo de administração pretendido e a solubilidade do polipéptido no transportador ou veículo seleccionado. A concentração eficaz é suficiente para melhorar a condição visada e pode ser determinada empiricamente utilizando métodos conhecidos dos peritos na especialidade. Para formular uma composição, a fracção em peso de polipéptido é dissolvida, suspensa, dispersa ou de outro modo misturada num veículo seleccionado numa concentração eficaz tal que a condição visada seja aliviada ou melhorada.

Em casos em que os polipéptidos de sHASEGP ou seu domínio de hialuronidase humana solúvel exibem solubilidade insuficiente, podem ser utilizados métodos para solubilização de polipéptidos. Estes métodos são conhecidos do peritos nesta especialidade, e incluem, mas não estão limitadas a, utilização de co-solventes, tais dimetilsulfóxido (DMSO), utilização de tensioactivos, tais como TWEEN® e Pluronic® F68; ou dissolução

em bicarbonato de sódio aquoso. Podem também ser utilizados derivados dos polipéptidos, tais como pró-fármacos dos polipéptidos, na formulação de composições farmacêuticas eficazes. Para indicações oftálmicas, as composições são formuladas num transportador oftalmicamente aceitável. Para as presentes utilizações oftálmicas, é contemplada a administração local, quer por administração tópica quer por injecção. São também desejáveis formulações de libertação prolongada. Tipicamente, as composições são formuladas para administração de uma dosagem única, tal que uma dosagem única administre uma quantidade eficaz.

Após mistura ou adição do polipéptido com o veículo, a mistura resultante pode ser uma solução, suspensão, emulsão ou outra composição e pode ser formulada como misturas aquosas, cremes, géis, pomadas, emulsões, soluções, elixires, loções, suspensões, tinturas, pastas, espumas, aerossóis, irrigações, pulverizações, supositórios, ligaduras, ou qualquer outra formulação adequada para administração sistémica, tópica ou local.

A forma da mistura resultante depende de vários factores, incluindo o modo de administração pretendido e a solubilidade do composto no transportador ou veículo seleccionado. Se necessário, são preparados sais farmaceuticamente aceitáveis ou outros derivados dos compostos. Para administração interna local, tal como administração intramuscular, parentérica ou intra-articular, os compostos são preferivelmente formulados como uma solução ou suspensão num meio de base aquosa, tal como solução salina tamponada isotonicamente, ou são combinados com um suporte biocompatível ou bioadesivo destinado a administração interna.

O polipéptido de sHASEGP ou seu domínio de hialuronidase humana solúvel é incluído no transportador farmaceuticamente aceitável numa quantidade suficiente para exercer um efeito terapeuticamente útil na ausência de efeitos secundários indesejáveis no paciente tratado. É entendido que o número e grau de efeitos secundários depende da condição para a qual os compostos são administrados. Por exemplo, quando se tratam doenças com ameaça para a vida, são tolerados certos efeitos secundários e tóxicos indesejáveis que não seriam tolerados

quando se tratam distúrbios de menores consequências. Quantidades eficazes para utilização terapêutica dependem obviamente da gravidade da doença e do peso e estado geral do sujeito bem como da via de administração. A administração local do agente terapêutico requererá tipicamente uma dosagem menor do que qualquer modo de administração sistémica, ainda que a concentração local do agente terapêutico, em alguns casos, possa ser mais elevada após administração local do que a que pode ser conseguida com segurança após administração sistémica.

Uma vez que sujeitos individuais podem apresentar uma ampla variação em gravidade de sintomas e cada agente terapêutico tem características terapêuticas únicas, compete ao praticante determinar a resposta de um sujeito ao tratamento e fazer variar as dosagens em conformidade. Dosagens utilizadas *in vitro* podem proporcionar linhas de orientação úteis nas quantidades úteis para administração *in situ* da composição farmacêutica e, nalguns casos, podem-se utilizar modelos animais para determinar dosagens eficazes para tratamento de distúrbios particulares. Em geral, porém, para administração local, é contemplado que uma quantidade eficaz do agente terapêutico será uma quantidade dentro da gama de cerca de 0,1 picogramas (pg) até cerca de 1 ng por kg de peso corporal. São conhecidas dos peritos na especialidade e estão descritas várias considerações para se chegar a uma quantidade eficaz (ver, *e.g.*, Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8.ª ed., Pergamon Press, 1990; Remington's Pharmaceutical Sciences, 17.ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990; e Mantyh *et al.* (Science, 278: 275-79, 1997), envolvendo a injecção intratecal de uma toxina-ligando específico neuronal).

As formulações dos polipéptidos de sHASEGP ou seus domínios de hialuronidase humana solúvel para a presente utilização incluem as adequadas para administração oral, rectal, tópica, por inalação, bucal (*e.g.*, sublingual), parentérica (*e.g.*, subcutânea, intramuscular, intradérmica ou intravenosa), transdérmica ou qualquer via. A via mais adequada em qualquer caso depende da natureza e da gravidade da condição que está a ser tratada e da natureza do composto activo particular que está a ser utilizado. As formulações são proporcionadas para administração a humanos e animais em formas de unidade de dosagem, tais como comprimidos, cápsulas, pílulas, pós,

grânulos, soluções ou suspensões parentéricas estéreis, e soluções ou suspensões orais, e emulsões de óleo-água contendo quantidades adequadas dos polipéptidos e/ou outros agentes ou seus derivados farmaceuticamente aceitáveis. Os polipéptidos farmacêuticos terapeuticamente activos e/ou outros agentes e seus derivados são tipicamente formulados e administrados em formas de dosagem unitária ou formas de dosagem múltipla. Uma forma de dosagem unitária como aqui utilizada refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas para sujeitos humanos e animais e embaladas individualmente como é conhecido na especialidade.

As composições farmacêuticas são proporcionadas para administração a humanos e animais em formas de unidade de dosagem, tais comprimidos, cápsulas, pílulas, pós, grânulos, soluções ou suspensões parentéricas estéreis, e soluções ou suspensões orais, e emulsões de óleo-água contendo quantidades adequadas do polipéptido de sHASEGP ou seu domínio de hialuronidase humana solúvel e, opcionalmente, outro agente ou seus derivados farmaceuticamente aceitáveis. Os compostos farmacêuticos terapeuticamente activos e seus derivados são tipicamente formulados e administrados em formas de dosagem unitária ou formas de dosagem múltipla. Uma forma de dosagem unitária como aqui utilizada refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas para sujeitos humanos e animais e embaladas individualmente como é conhecido na especialidade. Cada dose unitária contém uma quantidade predeterminada do composto terapeuticamente activo suficiente para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com o transportador, veículo ou diluente farmacêutico requerido. Exemplos de formas de dose unitária incluem, mas não estão limitadas a, ampolas, seringas e comprimidos ou cápsulas embalados individualmente. Por exemplo, uma formulação de pequeno volume contendo uma solução estabilizada com 1 a 5000 Unidades de sHASEGP num pequeno volume, tal como 5 a 50 µl, pode ser pré-embalada numa seringa para utilização, tal como após injecção viscoelástica. Formas de dose unitária podem ser administradas em suas fracções ou múltiplos. Uma forma de dose múltipla é uma pluralidade de formas de dosagem unitária idênticas embaladas num único recipiente para serem administradas em forma de dose unitária segregada. Exemplos de formas de dose múltipla incluem frascos para injectáveis, frascos de comprimidos ou cápsulas ou frascos

de pintos ou galões. Por isso, uma forma de dose múltipla é um múltiplo de doses unitárias que não estão segregadas na embalagem.

A composição pode conter, em conjunto com o ingrediente activo, tal como um polipéptido de sHASEGP: um diluente, tal como lactose, sacarose, fosfato de dicálcio ou carboximetilcelulose; um lubrificante, tal como estearato de magnésio, estearato de cálcio e talco; e um ligante tal como amido, gomas naturais, tais como goma-arábica, gelatina, glucose, melaços, polvinilpirrolidina, celuloses e seus derivados, povidona, crospovidonas e outros destes ligantes conhecidos dos peritos na especialidade. Composições líquidas administráveis farmaceuticamente podem ser preparadas, por exemplo, por dissolução, dispersão ou de outro modo mistura de um composto activo como definido acima e adjuvantes farmacêuticos opcionais num transportador, tal como, por exemplo, água, solução salina, dextrose aquosa, glicerol, glicóis, etanol, e outros, para desse modo formar uma solução ou suspensão. Se desejado, a composição farmacêutica a ser administrada pode também conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas tais como agentes molhantes, agentes emulsionantes ou agentes solubilizantes, agentes de tamponamento do pH e outros, por exemplo, acetato, citrato de sódio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitano, trietanolamina acetato de sódio, oleato de trietanolamina, e outros destes agentes. Métodos de preparação destas formas de dosagem são conhecidos ou serão evidentes para os peritos nesta especialidade (ver *e.g.*, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15.ª Edição, 1975). A composição ou formulação a ser administrada contém uma quantidade do composto activo numa quantidade suficiente para aliviar os sintomas do sujeito tratado. Por exemplo, uma formulação estabilizada padrão de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel, como aqui proporcionada, inclui 150 Unidades/ml da glicoproteína solúvel formulada em EDTA, NaCl e $CaCl_2$. Adicionalmente, pode estar presente na formulação um agente antibacteriano ou antifúngico, incluindo mas não limitado a tiomersal. Outra formulação aqui proporcionada é uma solução estabilizada ou forma liofilizada de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel em EDTA, NaCl e $CaCl_2$, contendo uma quantidade activa eficaz da glicoproteína solúvel,

tal como 150 Unidades/ml, com a adição de lactose, tal como 13 mg/ml. É também aqui proporcionada uma formulação contendo uma solução estabilizada ou forma liofilizada de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel em EDTA, NaCl e $CaCl_2$ contendo uma quantidade activa eficaz da glicoproteína solúvel, tal como 150 Unidades/ml, com a adição de lactose, tal como 13 mg/ml, e albumina, Pluronic® F68, TWEEN® e/ou outro detergente. Outra formulação aqui proporcionada, quer liofilizada quer como uma solução estabilizada, contém uma quantidade eficaz de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel, tal como 1 a 300 Unidades/ml, em EDTA, NaCl e $CaCl_2$.

Podem ser preparadas formas de dosagem ou composições contendo activo ingrediente na gama de 0,005% a 100% com saldo constituído de transportador não tóxico. Para administração oral, as composições farmacêuticas podem tomar a forma, por exemplo, de comprimidos ou cápsulas preparados por meios convencionais com excipientes farmaceuticamente aceitáveis tais como agentes ligantes (*e.g.*, amido de milho pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona ou hidroxipropilmetil-celulose); cargas (*e.g.*, lactose, celulose microcristalina ou hidrogenofosfato de cálcio); lubrificantes (*e.g.*, estearato de magnésio, talco ou sílica); desintegrantes (*e.g.*, amido de batata ou glicolato de amido sódico); ou agentes molhantes (*e.g.*, laurilsulfato de sódio). Os comprimidos podem ser revestidos por métodos bem conhecidos na especialidade.

As sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel ou derivados farmaceuticamente aceitáveis podem ser preparados com transportadores que protegem a glicoproteína solúvel contra a rápida eliminação do corpo, tais como formulações ou revestimentos de libertação prolongada. As composições podem incluir outros agentes farmaceuticamente eficazes conhecidos na especialidade geral como valiosos no tratamento de uma ou mais das doenças ou condições médicas, incluindo, mas não limitados a, um agente quimioterapêutico, um agente analgésico, um agente anti-inflamatório, um agente antimicrobiano, um agente amebicida, um agente tricomonacida, um agente anti-parkinsoniano, um agente antimalárico, um agente anticonvulsivo, um agente antidepressivo, um agente antiartrítico, um agente antifúngico, um agente anti-hipertensor, um agente antipirético, um agente antiparasitário,

um agente anti-histamínico, um agente agonista alfa-adrenérgico, um agente bloqueador alfa, um agente anestésico, um agente broncodilatador, um agente biocida, um agente bactericida, um agente bacteriostático, um agente bloqueador beta-adrenérgico, um agente bloqueador do canal de cálcio, um agente de fármaco cardiovascular, um agente contraceptivo, um agente descongestionante, um agente diurético, um agente depressivo, um agente de diagnóstico, um agente electrólito, um agente hipnótico, um agente hormonal, um agente hiperglicémico, um agente relaxante muscular, um agente contractor muscular, um agente oftálmico, um agente parassimpatomimético, um agente energético psíquico, um agente oftálmico, um agente parassimpatomimético, um agente energético psíquico, um agente sedativo, um agente simpatomimético, um agente tranquilizante, um agente urinário, um agente vaginal, um agente viricida, um agente vitamínico, um agente anti-inflamatório não esteróide, um agente inibidor da enzima de conversão de angiotensina, um polipéptido, uma proteína, um ácido nucleico, um fármaco, um pró-fármaco, uma molécula orgânica e um indutor do sono, para obter combinações desejadas de propriedades. Deve ser entendido que esta terapia de combinação constitui um aspecto adicional das composições e métodos de tratamento aqui proporcionados.

1. COMPOSIÇÕES PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL

As formas orais de dosagem farmacêutica são sólidas, géis ou líquidas. As formas de dosagem sólidas são comprimidos, cápsulas, grânulos e pós a granel. Tipos de comprimidos orais incluem pastilhas mastigáveis e comprimidos prensados, que podem ser revestidos entericamente, revestidos com açúcar ou revestidos com película. As cápsulas podem ser cápsulas de gelatina dura ou mole, enquanto os grânulos e pós podem ser proporcionados em forma não efervescente ou efervescente com a combinação de outros ingredientes conhecidos dos peritos na especialidade.

As composições farmacêuticas contendo uma sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel podem estar em forma líquida, por exemplo, soluções, xaropes ou suspensões, ou podem ser apresentadas como um produto farmacêutico para reconstituição com água ou outro veículo adequado antes da utilização. Estas preparações líquidas podem ser preparadas por

meios convencionais com aditivos farmaceuticamente aceitáveis tais como agentes de suspensão (*e.g.*, xarope de sorbitol, derivados de celulose ou gorduras alimentares hidrogenadas); agentes emulsionantes (*e.g.*, lecitina ou goma-arábica); veículos não aquosos (*e.g.*, óleo de amêndoa, ésteres oleosos ou óleos vegetais fraccionados); e conservantes (*e.g.*, p-hidroxibenzoatos de metilo ou propilo ou ácido sórbico).

Em certas concretizações, as formulações são formas de dosagem sólidas, preferivelmente cápsulas ou comprimidos. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, trociscos e outros podem conter qualquer dos ingredientes seguintes, ou compostos de uma natureza similar: um ligante; um diluente; um agente de desintegração; um lubrificante; um deslizante; um agente edulcorante; e um agente aromatizante.

Exemplos de ligantes incluem celulose microcristalina, goma adragante, solução de glucose, goma-arábica, solução de gelatina, sacarose e pasta de amido. Lubrificantes incluem talco, amido, estearato de magnésio ou cálcio, licopódio e ácido esteárico. Diluentes incluem, por exemplo, lactose, sacarose, amido, caulino, sal, manitol e fosfato de dicálcio. Deslizantes incluem, mas não estão limitados a, dióxido de silício coloidal. Agentes de desintegração incluem croscarmelose sódica, glicolato de amido sódico, ácido algínico, amido de milho, amido de batata, bentonite, metilcelulose, ágar e carboximetilcelulose. Agentes corantes incluem, por exemplo, qualquer dos corantes FD e C solúveis em água certificados aprovados, suas misturas; e corantes FD e C insolúveis em água suspensos em hidrato de alumina. Agentes edulcorantes incluem sacarose, lactose, manitol e agentes edulcorantes artificiais tais como sacarina, e inúmeros aromas secos por pulverização. Agentes aromatizantes incluem aromas naturais extraídos de plantas tais como frutos e misturas sintéticas de compostos que produzem uma sensação agradável, tais como, mas não limitados a hortelã-pimenta e salicilato de metilo. Agentes molhantes incluem monoestearato de propilenoglicol, monooleato de sorbitano, monolaurato de dietilenoglicol e lauriléter de polioxietileno. Revestimentos entéricos incluem ácidos gordos, gorduras, ceras, goma-laca, goma-laca amoniacal e acetatoftalatos de celulose. Revestimentos de película incluem

hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose sódica, polietilenoglicol 4000 e acetatoftalato de celulose.

Se se desejar a administração oral, a sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel poderá ser proporcionada numa composição que a protege do ambiente ácido do estômago. Por exemplo, a composição pode ser formulada num revestimento entérico que mantém a sua integridade no estômago e liberta o composto activo no intestino. A composição pode também ser formulada em combinação com um antiácido ou outro destes ingredientes.

Quando a forma de unidade de dosagem é uma cápsula, para além dos materiais do tipo anterior, esta pode conter um transportador líquido tal como um óleo gordo. Adicionalmente, as formas de unidade de dosagem podem conter vários outros materiais que modificam a forma física da unidade de dosagem, por exemplo, revestimentos de açúcar e outros agentes entéricos. Os compostos podem também ser administrados como um componente de um elixir, suspensão, xarope, hóstia, polvilho, pastilha elástica ou outros. Um xarope pode conter, para além dos compostos activos, sacarose como agente edulcorante e certos conservantes, pigmentos e corantes, e aromas.

A sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel pode também ser misturada com outros materiais activos que não prejudicam a acção desejada, ou com materiais que suplementam a acção desejada, tais como antiácidos, bloqueadores H2 e diuréticos. O ingrediente activo é um composto ou seu derivado farmaceuticamente aceitável como aqui descrito. Podem ser incluídas concentrações mais elevadas, até cerca de 98% em peso do ingrediente activo.

Transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluídos em comprimidos são ligantes, lubrificantes, diluentes, agentes de desintegração, agentes corantes, agentes aromatizantes e agentes molhantes. Comprimidos revestidos com revestimentos entéricos, por causa do revestimento entérico, resistem à acção do ácido do estômago e dissolvem-se ou desintegram-se nos intestinos neutros ou alcalinos. Comprimidos revestidos a açúcar são comprimidos prensados aos quais são aplicadas diferentes camadas de substâncias farmaceuticamente aceitáveis.

Comprimidos revestidos a película são comprimidos prensados que foram revestidos com um polímero ou outro revestimento adequado. Comprimidos multi-prensados são comprimidos prensados produzidos por mais do que um ciclo de compressão utilizando as substâncias farmaceuticamente aceitáveis previamente mencionadas. Agentes corantes podem também ser utilizados nas formas de dosagem anteriores. São utilizados agentes aromatizantes e edulcorantes em comprimidos prensados, revestidos a açúcar, multi-prensados e comprimidos mastigáveis. Agentes aromatizantes e edulcorantes são especialmente úteis na formação de comprimidos mastigáveis e pastilhas.

Formas de dosagem oral líquidas incluem soluções aquosas, emulsões, suspensões, soluções e/ou suspensões reconstituídas a partir de grânulos não efervescentes e preparações efervescentes reconstituídas a partir de grânulos efervescentes. Soluções aquosas incluem, por exemplo, elixires e xaropes. As emulsões são quer de óleo-em-água quer de água-em-óleo.

Os elixires são preparações hidroalcoólicas, adocicadas, límpidas. Transportadores farmaceuticamente aceitáveis utilizados em elixires incluem solventes. Os xaropes são soluções aquosas concentradas de um açúcar, por exemplo, sacarose, e podem conter um conservante. Uma emulsão é um sistema de duas fases no qual um líquido está disperso na forma de pequenos glóbulos através de outro líquido. Transportadores farmaceuticamente aceitáveis utilizados em emulsões são líquidos não aquosos, agentes emulsionantes e conservantes. As suspensões utilizam agentes de suspensão farmaceuticamente aceitáveis e conservantes. Substâncias farmaceuticamente aceitáveis utilizadas em grânulos não efervescentes, para serem reconstituídos numa forma de dosagem oral líquida, incluem diluentes, edulcorantes e agentes molhantes. Substâncias farmaceuticamente aceitáveis utilizadas em grânulos efervescentes, para serem reconstituídos numa forma de dosagem oral líquida, incluem ácidos orgânicos e uma fonte de dióxido de carbono. Agentes corantes e aromatizantes são utilizados em todas as formas de dosagem anteriores.

Solventes incluem glicerina, sorbitol, álcool etílico e xarope. Exemplos de conservantes incluem glicerina,

metilparabeno e propilparabeno, ácido benzóico, benzoato de sódio e álcool. Exemplos de líquidos não aquosos utilizados em emulsões incluem óleo mineral e óleo de semente de algodão. Exemplos de agentes emulsionantes incluem gelatina, goma-arábica, goma adragante, bentonite e tensioactivos tais como monooleato de polioxietileno sorbitano. Agentes de suspensão incluem carboximetilcelulose sódica, pectina, goma adragante, Veegum e goma-arábica. Diluentes incluem lactose e sacarose. Agentes edulcorantes incluem sacarose, xaropes, glicerina e agentes edulcorantes artificiais tais como sacarina. Agentes molhantes incluem monoestearato de propilenoglicol, monooleato de sorbitano, monolaurato de dietilenoglicol e lauriléter de polioxietileno. Aditivos orgânicos incluem ácido cítrico e tartárico. Fontes de dióxido de carbono incluem bicarbonato de sódio e carbonato de sódio. Agentes corantes incluem qualquer dos corantes FD e C solúveis em água certificados aprovados, e suas misturas. Agentes aromatizantes incluem aromas naturais extraídos de plantas tais como frutos, e misturas sintéticas de compostos que produzem uma sensação de sabor agradável.

Para uma forma de dosagem sólida, a solução ou suspensão, por exemplo, em carbonato de propileno, óleos vegetais ou triglicéridos, é encapsulado numa cápsula de gelatina. Estas soluções, e a sua preparação e encapsulação, são divulgadas nas Patentes U.S. N.os 4328245, 4409239 e 4410545. Para uma forma de dosagem líquida, a solução, *e.g.*, por exemplo, num polietilenoglicol, pode ser diluída com uma quantidade suficiente de um transportador líquido farmaceuticamente aceitável, *e.g.*, água, para ser facilmente medida para administração.

Alternativamente, formulações orais líquidas ou semi-sólidas podem ser preparadas por dissolução ou dispersão da sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel em óleos vegetais, glicóis, triglicéridos, ésteres de propilenoglicol (*e.g.*, carbonato de propileno) e outros destes transportadores, e encapsulação destes soluções ou suspensões em invólucros de cápsula de gelatina dura ou mole. Outras formulações úteis incluem as apresentadas nas Patentes U.S. N.os Re 28819 e 4358603.

Formulações adequadas para administração bucal (sublingual) incluem, por exemplo, pastilhas contendo a sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel numa base aromatizada, usualmente sacarose e goma-arábica ou goma adragante; e pastilhas contendo o composto numa base inerte tal como gelatina e glicerina ou sacarose e goma-arábica.

Em todas as concretizações, formulações de comprimidos e cápsulas podem ser revestidas como conhecido pelos peritos na especialidade de modo a modificar ou retardar a dissolução do ingrediente activo. Assim, por exemplo, estes podem ser revestidos com um revestimento convencional digerível entericamente, tal como salicilato de fenilo, ceras e acetatoftalato de celulose.

2. Injectáveis, soluções e emulsões

É também aqui contemplada a administração parentérica da sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel, geralmente caracterizada por injecção, subcutaneamente, intramuscularmente ou intravenosamente. Os injectáveis podem ser preparados em formas convencionais, como soluções ou suspensões líquidas; formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injecção, ou como emulsões. Excipientes adequados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol ou etanol. Adicionalmente, se desejado, as composições farmacêuticas a serem administradas podem também conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes de tamponamento de pH, estabilizantes, intensificadores de solubilidade, e outros destes agentes, tais como, por exemplo, acetato de sódio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina e ciclodextrinas. É também aqui contemplada a implantação de um sistema de libertação retardada ou prolongada, de modo a manter um nível constante de dosagem (ver, *e.g.*, Patente U.S. N.º 3710795). A percentagem da sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel contida nestas composições parentéricas está dependente da sua natureza específica, bem como da actividade do composto e das necessidades do sujeito.

A administração parentérica das composições inclui administração intravenosa, subcutânea e intramuscular. Preparações para administração parentérica incluem soluções estéreis prontas para injecção, produtos solúveis secos estéreis, tais como pós liofilizados, prontos para serem combinados com um solvente ou solução estéril imediatamente antes da utilização, incluindo comprimidos hipodérmicos, suspensões estéreis prontas para injecção, produtos insolúveis secos estéreis prontos para serem combinados com um veículo imediatamente antes da utilização e emulsões estéreis. As soluções podem ser quer aquosas quer não aquosas.

Se administrados intravenosamente, transportadores adequados incluem solução salina fisiológica ou solução salina tamponada com fosfato (PBS), e soluções contendo agentes espessantes e solubilizantes, tais como glucose, polietilenoglicol e polipropilenoglicol, e suas misturas.

Transportadores farmaceuticamente aceitáveis utilizados em preparações parentéricas incluem veículos aquosos, veículos não aquosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampões, antioxidantes, anestésicos locais, agentes de suspensão e dispersão, agentes emulsionantes, agentes sequestrantes ou quelantes e outras substâncias farmaceuticamente aceitáveis.

Exemplos de veículos aquosos incluem injecção de cloreto de sódio, injecção de Ringer, injecção de dextrose isotónica, injecção de água esterilizada, injecção de Ringer lactado e dextrose. Veículos parentéricos não aquosos incluem óleos essenciais de origem vegetal, óleo de semente de algodão, óleo de milho, óleo de sésamo e óleo de amendoim. Têm de ser adicionados agentes antimicrobianos em concentrações bacteriostáticas ou fungistáticas a preparações parentéricas embaladas em recipientes de dose múltipla que incluem fenóis ou cresóis, mercuriais, álcool benzílico, clorobutanol, ésteres de metilo e propilo de ácido p-hidroxibenzóico, tiomersal, cloreto de benzalcónio e cloreto de benzetónio. Agentes isotónicos incluem cloreto de sódio e dextrose. Tampões incluem fosfato e citrato. Antioxidantes incluem bissulfato de sódio. Anestésicos locais incluem cloridrato de procaína. Agentes de suspensão e dispersão incluem carboximetilcelulose sódica, hidroxipropilmetilcelulose e polivinilpirrolidona. Agentes

emulsionantes incluem polissorbato 80 (TWEEN® 80). Um agente sequestrante ou quelante de iões metálicos inclui EDTA. Transportadores farmacêuticos incluem também álcool etílico, polietilenoglicol e propilenoglicol para veículos miscíveis com água e hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido cítrico ou ácido láctico para ajustamento do pH.

A concentração do composto farmaceuticamente activo é ajustada tal que uma injecção proporcione uma quantidade eficaz para produzir o efeito farmacológico desejado. A dose exacta depende da idade, peso e condição do paciente ou animal como é conhecido na especialidade.

As preparações parentéricas de dose unitária são embaladas numa ampola, num frasco para injectáveis ou numa seringa com uma agulha. Todas as preparações para administração parentérica têm de ser estéreis, como é conhecido e praticado na especialidade.

Ilustrativamente, a perfusão intravenosa ou intra-arterial de uma solução aquosa estéril contendo um composto activo é um modo de administração eficaz. Outra concretização é uma solução ou suspensão aquosa ou oleosa estéril contendo um material activo injectada como necessário para produzir o efeito farmacológico desejado.

Os injectáveis são desenhados para administração local e sistémica. Tipicamente, uma dosagem terapeuticamente eficaz é formulada para conter uma concentração de pelo menos cerca de 0,1% p/p até cerca de 90% p/p ou mais, preferivelmente mais do que 1% p/p do composto activo para o(s) tecido(s) tratado(s). O ingrediente activo, tal como uma sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel, pode ser administrado de uma só vez, ou pode ser dividido em várias doses mais pequenas para serem administradas a intervalos de tempo. É entendido que a dosagem precisa e a duração de tratamento são uma função do tecido que está a ser tratado e podem ser determinadas empiricamente utilizando protocolos de ensaio conhecidos ou por extrapolação a partir de resultados de ensaios *in vivo* ou *in vitro*. É de notar que as concentrações e os valores de dosagem podem também variar com a idade do indivíduo tratado. Deve ainda ser entendido que, para qualquer sujeito particular, os regimes

de dosagem específicos deverão ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade do indivíduo e o discernimento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das formulações, e que as gamas de concentração aqui apresentadas são apenas exemplares e não se pretende que limitem o âmbito ou a prática das formulações reivindicadas.

Os compostos aqui proporcionados podem ser formulados para administração parentérica por injecção, *e.g.*, por injecção bólus ou perfusão contínua. As formulações para injecção podem ser apresentadas em formas de dosagem unitária, *e.g.*, em ampolas, ou em recipientes multi-doses, com um conservante adicionado. As composições podem ser suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão. Alternativamente, o ingrediente activo pode estar em forma de pó para reconstituição com um veículo adequado, *e.g.*, água isenta de pirogénio estéril ou outros solventes, antes da utilização. Por exemplo, são aqui proporcionadas formulações parentéricas contendo uma quantidade eficaz de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel, tal como 500 a 500000 Unidades, numa solução estabilizada ou numa forma liofilizada.

O composto pode ser suspenso numa forma micronizada ou noutra forma adequada ou pode ser derivatizado para produzir um produto activo mais solúvel ou para produzir um pró-fármaco. A forma da mistura resultante depende de vários factores, incluindo o modo de administração pretendido e a solubilidade do composto no transportador ou veículo seleccionado. A concentração eficaz é suficiente para melhorar os sintomas da condição e pode ser determinada empiricamente.

3. Pós liofilizados

São também aqui proporcionados pós liofilizados contendo sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel, que podem ser reconstituídos para administração como soluções, emulsões e outras misturas. Estas formulações podem também ser reconstituídas e formuladas como sólidos ou géis.

O pó liofilizado estéril é preparado por dissolução de uma porção sólida ou mistura de uma alíquota de uma solução contendo uma sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel num solvente adequado. O solvente pode conter um excipiente que melhora a estabilidade ou outro componente farmacológico do pó ou solução reconstituída, preparada a partir do pó. Excipientes que podem ser utilizados incluem, mas não estão limitadas a, dextrose, sorbitol, frutose, xarope de milho, xilitol, glicerina, glucose, sacarose, lactose ou outro agente adequado. O solvente pode também conter um tampão, tal como citrato, fosfato de sódio ou potássio ou outros destes tampões conhecidos dos peritos na especialidade, tipicamente, a cerca de pH neutro. A filtração esterilizante subsequente da solução seguida por liofilização sob condições padrão conhecidas dos peritos na especialidade proporciona a formulação liofilizada. Geralmente, a solução resultante da filtração esterilizante é repartida em frascos para injectáveis para liofilização. Cada frasco para injectáveis pode conter uma dosagem individual, tal como 10-1000 mg ou 100-500 mg, ou múltiplas dosagens do composto.

Resumidamente, o pó liofilizado é preparado por dissolução de dextrose, sorbitol, frutose, xarope de milho, xilitol, glicerina, glucose, sacarose, lactose ou outro agente adequado, cerca de 1-20%, num tampão adequado, tal como citrato, fosfato de sódio ou potássio ou outros destes tampões conhecidos dos peritos na especialidade a cerca de pH neutro. Depois, adiciona-se um sal seleccionado, tal como, por exemplo, o sal de sódio da sHASEGP (cerca de 1 g do sal por 10-100 g da solução tampão, tipicamente cerca de 1 g/30 g), à mistura resultante acima da temperatura ambiente, tal como a cerca de 30-35°C, e agita-se até este se dissolver. Dilui-se a mistura resultante adicionando mais tampão, para diminuir a concentração resultante do sal em cerca de 10-50%, tipicamente cerca de 15-25%). A mistura resultante é esterilizada por filtração ou tratada para remover particulados e para assegurar a esterilidade, e repartida em frascos para injectáveis para liofilização. O pó liofilizado pode ser armazenado sob condições apropriadas, tais como de cerca de 4ºC até à temperatura ambiente.

A reconstituição deste pó liofilizado com água para injecção proporciona uma formulação para utilização em administração parentérica. Para reconstituição, uma quantidade

terapeuticamente eficaz do pó liofilizado contendo uma sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel é adicionada por mililitro de água estéril ou outro transportador adequado. A quantidade precisa depende do composto seleccionado e pode ser determinada empiricamente por métodos conhecidos dos peritos na especialidade.

4. Administração tópica

São preparadas misturas tópicas como descrito para a administração local e sistémica. A mistura resultante pode ser uma solução, suspensão, emulsões ou outras, e são formuladas como cremes, géis, pomadas, emulsões, soluções, elixires, loções, suspensões, tinturas, pastas, espumas, aerossóis, irrigações, pulverizações, supositórios, ligaduras, sistemas transdérmicos ou quaisquer outras formulações adequadas para administração tópica.

As composições de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel ou seus derivados farmaceuticamente aceitáveis podem ser formuladas como aerossóis para aplicação tópica, tal como por inalação (ver, *e.g.*, Patentes U.S. N.ºs 4044126, 4414209 e 4364923, que descrevem aerossóis para entrega de um esteróide úteis para tratamento de doenças inflamatórias, particularmente asma). Estas formulações para administração ao tracto respiratório podem estar na forma de um aerossol ou solução para um nebulizador, ou como um pó microfino para insuflação, sozinhas ou em combinação com um transportador inerte tal como lactose. Neste caso, as partículas da formulação terão tipicamente diâmetros inferiores a 50 mícron, tais como inferiores a 10 mícron.

Para administração por inalação, as composições para a presente utilização podem ser entregues na forma de uma apresentação de pulverização em aerossol a partir de embalagens pressurizadas ou de um nebulizador, com a utilização de um propulsor adequado, incluindo, mas não limitado a, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono e outros gases adequados. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada proporcionando uma válvula para

entregar uma quantidade medida. Para utilização num inalador ou insuflador, podem ser formuladas cápsulas e cartuchos, *e.g.*, de gelatina, contendo uma mistura de pó do composto e uma base de pó adequada tal como lactose ou amido.

As composições podem ser formuladas para aplicação local ou tópica, tal como para aplicação tópica à pele e às membranas mucosas, tais como no olho, na forma de géis, cremes e loções, e para aplicação ao olho ou para aplicação intracisternal ou intraespinal. A administração tópica é contemplada para entrega transdérmica e também para administração aos olhos ou mucosa, ou para terapias de inalação. Podem também ser administradas soluções nasais do composto sozinho ou em combinação com outros excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

Por exemplo, formulações adequadas para aplicação tópica à pele ou ao olho são geralmente formuladas como uma pomada, creme, loção, pasta, gel, pulverização, aerossol e óleo. Transportadores que podem ser utilizados incluem vaselina, lanolina, polietilenoglicóis, álcoois e suas combinações de dois ou mais. As formulações tópicas podem conter ainda vantajosamente 0,05 a 15 por cento em peso de espessantes, incluindo, mas não limitados a, hidroxipropilmetilcelulose, metilcelulose, polivinilpirrolidona, poli(álcool vinílico), poli(alquilenoglicóis), poli-hidroxialquilo, (met)acrilatos ou poli(met)acrilamidas. Uma formulação tópica é frequentemente aplicada por instilação ou como uma pomada no saco conjuntivo. Pode também ser utilizada para irrigação ou lubrificação do olho, seios faciais e meato auditivo externo. As formulações tópicas no estado líquido podem também estar presentes numa matriz polimérica tridimensional hidrófila na forma de uma fita, lente de contacto e outros, a partir dos quais os componentes activos são libertados. Podem também ser injectadas na câmara anterior do olho e noutros locais. Por exemplo, é aqui proporcionada uma formulação para utilização intra-ocular após injecção de um viscoelástico contendo uma solução estabilizada de uma quantidade eficaz de uma sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel, tal como 1 a 5000 Unidades da glicoproteína solúvel com 30 a 150 000 Unidades/mg de actividade específica, num pequeno volume, tal como 5 a 50 µl.

Estas soluções, particularmente as destinadas a utilização oftálmica, podem ser formuladas como soluções 0,01% - 10% isotónicas, pH cerca de 5-7, com sais apropriados.

5. Composições para outras vias de administração

São também aqui contempladas outras vias de administração, tais como aplicação tópica, sistemas transdérmicos e administração rectal.

Por exemplo, formas de dosagem farmacêutica para administração rectal são supositórios rectais, cápsulas e comprimidos para efeito sistémico. Supositórios rectais como aqui utilizados significam corpos sólidos para inserção no recto que derretem ou amolecem à temperatura corporal libertando um ou mais ingredientes farmacologicamente ou terapeuticamente activos. Substâncias farmaceuticamente aceitáveis utilizadas em supositórios rectais são bases ou veículos e agentes para elevar o ponto de fusão. Exemplos de bases incluem manteiga de cacau (óleo de teobroma), glicerina-gelatina, carbowax (polioxietilenoglicol) e misturas apropriadas de mono-, di- e triglicéridos de ácidos gordos. Podem ser utilizadas combinações das várias bases. Agentes para elevar o ponto de fusão de supositórios incluem espermacete e cera. Podem ser preparados supositórios rectais quer pelo método de compressão quer por moldagem. O peso típico de um supositório rectal é cerca de 2 a 3 g.

Comprimidos e cápsulas para administração rectal são fabricados utilizando a mesma substância farmaceuticamente aceitável e pelos mesmos métodos que para as formulações para administração oral.

Formulações adequadas para administração transdérmica podem ser apresentadas como sistemas transdérmicos discretos adaptados para permanecerem em contacto íntimo com a epiderme do recipiente durante um período de tempo prolongado. Estes sistemas transdérmicos contêm adequadamente o composto activo como uma solução aquosa opcionalmente tamponada, por exemplo, com uma concentração 0,1 a 0,2 M em relação ao composto activo. Formulações adequadas para administração transdérmica podem também ser entregues por iontoforese (ver *e.g.*, Pharmaceutical

Research 3 (6): 318 (1986)) e tipicamente tomam a forma de uma solução aquosa opcionalmente tamponada do composto active.

As composições farmacêuticas podem também ser administradas por meios e/ou dispositivos de entrega de libertação controlada (ver *e.g.*, Patentes U.S. N.os 3536809, 3598123, 3630200, 3845770, 3847770, 3916899, 4008719, 4687610, 4769027, 5059595, 5073543, 5120548, 5354566, 5591767, 5639476, 5674533 e 5733566). Os compostos activos ou derivados farmaceuticamente aceitáveis podem ser preparados com transportadores que protegem o composto contra a rápida eliminação do corpo, tais como formulações ou revestimentos de libertação prolongada.

Numa concretização das composições e métodos aqui proporcionados, o agente terapêutico é administrado localmente num veículo de entrega de libertação retardada, por exemplo, encapsulado num sistema de dispersão coloidal ou em cristais estabilizados por polímero. Sistemas de dispersão coloidal úteis incluem nanocápsulas, microesferas, pérolas e sistemas baseados em lípido, incluindo emulsões de óleo-em-água, micelas, micelas mistas e lipossomas. Por exemplo, o sistema de dispersão coloidal pode ser um lipossoma ou microesfera. Os lipossomas são vesículas de membrana artificiais que são úteis como veículos de entrega de libertação retardada quando injectados ou implantados. Alguns exemplos de conjugados de lípido-polímero e de lipossomas são divulgados na Patente U.S. N.º 5631018.

Outros exemplos de veículos de entrega de libertação retardada são matrizes de hidrogel biodegradáveis (Patente U.S. N.º 5041292), conjugados de polímeros dendríticos (Patente U.S. N.º 5714166) e lipossomas multivesiculares (Depofoam®, Depotech, San Diego, CA) (Patentes U.S. N.os 5723147 e 5766627). Um tipo de microesferas adequadas para encapsulação de agentes terapêuticos para injecção local (*e.g.*, em tecido subdérmico) é o das microesferas de poli(D,L)lactida, como descrito em D. Fletcher, Anesth. Analg. 84:90-94, (1997). Por exemplo, uma formulação de libertação retardada contendo uma quantidade eficaz de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel, tal como 1 a 5000 Unidades/ml, pode ser empregue para várias utilizações ou para tratar várias condições, incluindo,

mas não limitadas a, formulações cosméticas e tratamento de lesões na medula espinal.

Níveis desejáveis no sangue podem ser mantidos por uma perfusão contínua do agente activo conforme comprovado pelos níveis no plasma. Será de notar que o médico assistente saberá como e quando terminar, interromper ou ajustar a terapia para diminuir a dosagem devido a toxicidade, ou a disfunções de medula óssea, fígado ou rim. Reciprocamente, o médico assistente saberá também como e quando ajustar o tratamento a níveis mais elevados se a resposta clínica não for adequada (evitando os efeitos secundários tóxicos).

A eficácia e/ou toxicidade do polipéptido de sHASEGP, e/ou seus inibidor(es), sozinhos ou em combinação com outros agentes, tais como agentes terapeuticamente eficazes, podem também ser avaliadas pelos métodos conhecidos na especialidade (ver, *e.g.*, O & Apos; Reilly, Investigational New Drugs 15: 5-13 (1997)).

6. Artigos fabricados

Os polipéptidos de sHASEGP ou seus domínios de hialuronidase humana solúvel, ou composições contendo qualquer dos agentes precedentes, podem ser embalados como artigos de fabrico contendo material de embalagem, um composto ou seu derivado adequado aqui proporcionado, que é eficaz para tratamento de doenças ou distúrbios aqui contemplados, dentro do material de embalagem, e um rótulo que indica que o composto ou um seu derivado adequado é para o tratamento das doenças ou distúrbios aqui contemplados. O rótulo pode incluir opcionalmente os distúrbios para os quais a terapia é garantida.

Os artigos fabricados aqui proporcionados contêm materiais de embalagem. Materiais de embalagem para utilização na embalagem de produtos farmacêuticos são bem conhecidos dos peritos na especialidade (ver, *e.g.*, Patentes U.S. N.ºs 5323907, 5052558 e 5033352). Exemplos de materiais de embalagem farmacêutica incluem, mas não estão limitadas a, embalagens blíster, frascos, tubos, inaladores, bombas, sacos, frascos para injectáveis, recipientes, seringas, garrafas, e qualquer material de embalagem adequado para uma formulação seleccionada e modo de administração e tratamento pretendidos. É proporcionado um vasto conjunto de formulações dos compostos e

composições, bem como uma variedade de tratamentos para qualquer distúrbio no qual está implicada uma infecção de HCV como mediador ou contribuinte para os sintomas ou causa.

São também aqui proporcionados *kits* contendo as composições e/ou as combinações com instruções para a sua administração. O *kit* pode incluir ainda uma agulha ou seringa, tipicamente embalada em forma estéril, para injecção do complexo, e/ou um tampão impregnado em álcool embalado. São opcionalmente incluídas instruções para administração do agente activo por um clínico ou pelo paciente. Por exemplo, é aqui proporcionado um *kit* contendo uma seringa de pequeno volume com uma quantidade eficaz de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel, tal como 1 a 5000 Unidades da glicoproteína solúvel, num volume de 5 a 50 µl, opcionalmente contendo uma segunda seringa contendo um viscoelástico. É também aqui proporcionado um *kit* contendo uma seringa de pequeno volume contendo uma quantidade eficaz de sHASEGP ou um seu domínio de hialuronidase humana solúvel, tal como 1 a 500 Unidades da glicoproteína solúvel, e uma quantidade terapêutica de um segundo ingrediente activo, tal como um fármaco, uma pequena molécula, uma proteína ou um ácido nucleico.

K. MODELOS ANIMAIS

São aqui proporcionados animais e modelos animais transgénicos, tais como roedores, incluindo ratinhos e ratos, vacas, galinhas, porcos, cabras, ovelhas, macacos, incluindo gorilas, e outros primatas. Em particular, são proporcionados animais não humanos transgénicos que contêm ácido nucleico heterólogo codificando um polipéptido de sHASEGP ou um animal transgénico no qual a expressão do polipéptido foi alterada, tal como por substituição ou modificação da região de promotor ou doutra região reguladora do gene endógeno. Um tal animal pode ser produzido promovendo a recombinação entre ácido nucleico endógeno e um gene de sHASEGP exógeno que poderá ser sobre-expresso ou expresso indevidamente, tal como por expressão sob um promotor forte, através de um evento de recombinação homóloga ou outra.

Animais transgénicos podem ser produzidos por introdução do ácido nucleico utilizando qualquer método de entrega conhecido, incluindo, mas não limitado a, micro-injecção,

lipofecção e outros modos de entrega génica a uma célula de linha germinal ou a células somáticas, tais como uma célula estaminal embrionária. Tipicamente, o ácido nucleico é introduzido numa célula, tal como uma célula estaminal embrionária (ES), seguindo-se a injecção das células ES num blastocisto, e implantação do blastocisto numa mãe de criação, seguida pelo nascimento de um animal transgénico. Geralmente, a introdução de uma molécula de ácido nucleico heteróloga num cromossoma do animal ocorre por uma recombinação entre o ácido nucleico codificando sHASEGP heterólogo e ácido nucleico endógeno. O ácido nucleico heterólogo pode ser direccionado a um cromossoma específico. Nalguns casos, podem ser produzidos animais *knockout*. Um tal animal pode ser produzido inicialmente promovendo a recombinação homóloga entre um gene de polipéptido de sHASEGP no seu cromossoma e um gene de polipéptido de sHASEGP exógeno que foi tornado biologicamente inactivo (tipicamente por inserção de uma sequência heteróloga, *e.g.*, um gene de resistência a antibiótico). Numa concretização, esta recombinação homóloga é realizada por transformação de células estaminais derivadas de embrião (ES) com um vector contendo o gene de polipéptido de sHASEGP inactivado por inserção, tal que ocorra recombinação homóloga, seguindo-se a injecção das células ES num blastocisto, e implantação do blastocisto numa mãe de criação, seguida pelo nascimento do animal quimérico ("anima *knockout*") no qual um gene de polipéptido de sHASEGP foi inactivado (ver Capecchi, Science 244: 1288-1292 (1989)). O animal quimérico pode ser reproduzido para produzir animais *knockout* homozigóticos, que podem depois ser utilizados para produzir animais *knockout* adicionais. Animais *knockout* incluem, mas não estão limitadas a, ratinhos, *hamsters*, ovelhas, porcos, gado e outros mamíferos não humanos. Por exemplo, é produzido um ratinho *knockout*. Os animais resultantes podem servir como modelos de doenças específicas, tais como cancros, que exibem sub-expressão de um polipéptido de sHASEGP. Estes animais *knockout* podem ser utilizados como modelos animais destas doenças *e.g.*, para rastrear ou testar moléculas quanto à capacidade para tratar ou prevenir tais doenças ou distúrbios.

Podem também ser produzidos outros tipos de animais transgénicos, incluindo aqueles que sobre-expressam o polipéptido de sHASEGP. Tais animais incluem animais "*knock-in*" que são animais nos quais o gene normal está substituído por

uma variante, tal como um mutante, uma forma sobre-expressa, ou outra forma. Por exemplo, um gene endógeno de uma espécie, tal como um gene endógeno de roedor, pode estar substituído pelo gene de outra espécie, tal como de um humano. Podem também ser produzidos animais por recombinação não homóloga noutros locais num cromossoma; incluindo animais que possuem uma pluralidade de eventos de integração.

Após produção do animal transgénico de primeira geração, um animal quimérico pode ser reproduzido para produzir animais adicionais que sobre-expressam ou expressam indevidamente polipéptidos de sHASEGP. Tais animais incluem, mas não estão limitadas a, ratinhos, *hamsters*, ovelhas, porcos, gado e outros mamíferos não humanos. Os animais resultantes podem servir como modelos de doenças específicas, tais como cancros, que exibem sobre-expressão ou expressão indevida de um polipéptido de sHASEGP. Estes animais podem ser utilizados como modelos animais destas doenças *e.g.*, para rastrear ou testar moléculas quanto à capacidade para tratar ou prevenir tais doenças ou distúrbios. Numa concretização específica, é produzido um ratinho com polipéptido de sHASEGP sobre-expresso ou expresso indevidamente.

Os exemplos seguintes são incluídos apenas para fins ilustrativos e não se pretende que limitem o âmbito do invento.

L. UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS DE sHASEGP

Enzimas hialuronidase de ocorrência natural a partir de matadouros têm sido a principal fonte de preparações de enzima clínica durante mais de quarenta anos. Testículos de bovino e de ovino são a principal fonte deste material. Estas preparações de enzima clínica são no entanto muito imperfeitas, vendidas em preparações variando de 0,5-5% de pureza com base em actividades específicas conhecidas entre 30-100 000 Unidades/mg. Assim, a sua falta de pureza combinada com a sua origem de matadouro, tornam estas não só imunogénicas para humanos mas também uma fonte potencial da doença de Creutzfeld-Jacob e de outros patogénios de bovino e ovino. É conhecido que ocorrem reacções anafilácticas a preparações de hialuronidase de bovino e ovino.

Hialuronidase derivada de gado ou de bactérias tem sido utilizada no tratamento de doenças associadas com ácido

hialurónico em excesso e para melhorar a circulação de fluidos fisiológicos e/ou agentes terapêuticos. Por exemplo, hialuronidase bovina pode ser co-injectada com anestesia em bloqueios peribulbar, retrobulbar e subtenoniano para procedimentos cirúrgicos oftálmicos. Além disso, ocorrem na sua ausência complicações cirúrgicas acrescidas (Brown S.M. *et al.* J. Cataract Refract. Surg. Set 1999; 25(9): 1245-9). A hialuronidase bovina é também utilizada como um antídoto para a necrose local resultante da injecção paravenosa de substâncias necróticas tais como alcalóides vinca (Few, B.J. (1987) Amer. J. Matern. Child Nurs. 12, 23-26). A hialuronidase de testículos de bovino é também útil para o tratamento de cistos ganglionares (Paul *et al.* J. Hand Surg. Abr 1997; 22 (2): 219-21). A hialuronidase pode também ser utilizada para facilitar a entrega subcutânea de fluidos em hipodermoclise (Berger E.Y., Am. Geriatr. Soc. Mar 1984; 32(3):199-203). A hialuronidase tem também sido utilizada para reduzir a pressão intra-ocular nos olhos de pacientes de glaucoma e de pacientes de catarata que receberam viscoelásticos (Patente U.S. N.º 4820516 concedida em 11 de Abril de 1989).

Hialuronidases derivadas de gado ou de bactérias têm também sido utilizadas como "agente de disseminação" para melhorar a actividade de agentes quimioterapêuticos e/ou a acessibilidade de tumores a agentes quimioterapêuticos (Schuller *et al.*, 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32:173, abstract no. 1034; Czejka *et al.*, 1990, Pharmazie 45:H.9). A quimioterapia de combinação com hialuronidase é eficaz no tratamento de uma variedade de cancros incluindo cancro da bexiga urinária (Horn *et al.*, 1985, J. Surg. Oncol. 28:304-307), carcinoma de células escamosas (Kohno *et al.*, 94, J. Cancer Res. Oncol. 120:293-297), cancro da mama (Beckenlehner *et al.*, 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118:591-596), e cancro gastrointestinal (Scheithauer *et al.*, 1988, Anticancer Res. 8:391-396). A hialuronidase é eficaz como o único agente terapêutico no tratamento de cancro do cérebro (gliomas) (Pedido de Patente PCT publicado n.º WO88/02261, publicado em 7 de Abril de 1988). A administração de hialuronidase induz também responsividade de tumores anteriormente resistentes à quimioterapia do pâncreas, estômago, cólon, ovários e mama (Baumgartner *et al.*, 1988, Reg. Cancer Treat. 1:55-58; Zanker *et al.*, 1986, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27:390). Infelizmente, os contaminantes e a natureza

não humana destas hialuronidases resultam em reacções anafilácticas.

Para além dos seus efeitos anticancerosos indirectos, a hialuronidase derivada de gado tem efeitos anticarcinogénicos directos. A hialuronidase impede o crescimento de tumores transplantados em ratinhos (De Maeyer *et al.*, 1992, Int. J. Cancer 51:657-660) e inibe a formação de tumor após a exposição a carcinogéneos (Pawlowski *et al.*, 1979, Int. J. Cancer 23:105-109; Haberman *et al.*, 1981, Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Washington, D.C., 22:105, abstract no. 415).

Considerando o valor de hialuronidases obtidas a partir de gado como agente terapêutico, particularmente em quimioterapia em conjunção com agentes quimioterapêuticos convencionais ou como um agente quimioterapêutico em si mesmo, existe uma necessidade no campo de preparações substancialmente puras de hialuronidase de origem humana. Existe também uma necessidade de métodos eficientes, eficazes em termos de custo, para produzir hialuronidase para proporcionar quantidades comercialmente significativas da enzima. O presente invento aborda estes problemas.

O ácido hialurónico é um componente essencial da matriz extracelular. O ácido hialurónico é encontrado no tecido conjuntivo de mamíferos e é o principal constituinte do vítreo do olho. Em tecido conjuntivo, a água de hidratação associada com ácido hialurónico cria espaços entre tecidos, criando assim um ambiente conducente ao movimento e proliferação celulares. Ácido hialurónico desempenha um papel chave em fenómenos biológicos associados com a motilidade celular incluindo rápido desenvolvimento, regeneração, reparação, embriogénese, desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, angiogénese e tumorigénese (Toole, 1991, Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, New York, 1384-1386; Bertrand *et al.*, 1992, Int. J. Cancer 52:1-6; Knudson *et al.*, 1993, FASEB J. 7:1233-1241). Adicionalmente, os níveis de ácido hialurónico estão correlacionados com a agressividade do tumor (Ozello *et al.*, 1960, Cancer Res. 20:600-604; Takeuchi *et al.*, 1976, Cancer Res. 36:2133-2139; Kimata *et al.*, 1983, Cancer Res. 43:1347-1354).

Após lesão da medula espinal, são produzidas cicatrizes gliais por astrócitos e contêm proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG). Os CSPG desempenham um papel crucial na inibição do crescimento de axónios (Levine, 1994; Powell *et al.*, 1997). Por exemplo, durante o desenvolvimento fetal, os CSPG repelem os axónios e inibem a adesão de células neurais. Os CSPG desempenham também um papel importante na formação de fronteiras (Snow *et al.*, 1990, 1992; Powell e Geller, 1999). Adicionalmente, a expressão de CSPG aumenta após lesão do SNC (Mckeon *et al.*, 1991; Davies *et al.*, 1997).

Estudos indicam que os efeitos inibidores de CSPG são principalmente devidos à cadeia de açúcar de glicosaminoglicano (GAG) de sulfato de condroitina (CS) (Snow *et al.*, 1990; Cole e McCable, 1991; Geisert e Bidanset, 1993). Isto é suportado pela constatação de que a administração de condroitinase bacteriana promove de facto a regeneração de axónios quando administrada intratecalmente. Para além disso, experiências electrofisiológicas determinaram que axónios de CST regenerados estabeleceram conexões funcionais (Bradbury, *et al.* 2002). Para além dos seus efeitos inibidores directos, os CSPG poderão também interagir com moléculas de adesão celular ou factores neurotróficos para influenciar o desenvolvimento de neurites (Roberts *et al.*, 1988; Ruoslahti e Yamaguchi, 1991; Milev *et al.*, 1994). As hialuronidases de mamífero recombinantes são assim úteis para reverter a inibição de CSPG na cicatriz glial e para promover a regeneração de axónios após lesão.

A quantidade de sHASEGP requerida para degradar suficientemente os CSPG na cicatriz glial variará. Nalguns casos, será requerida a administração repetida de 10-5000 Unidades de sHASEGP por entrega intratecal para remover os CSPG na cicatriz. Noutros casos, pode ser preferida a libertação controlada de sHASEGP através da utilização de uma formulação de libertação retardada. Alternativamente, a administração de vectores de terapia génica codificando sHASEGP pode ser eficaz para melhorar a depuração de CSPG.

As sHASEGP podem também ser utilizadas para o tratamento de discos herniados num processo conhecido como quimionucleólise. A condroitinase ABC, uma enzima que cliva

substratos similares aos de sHASEGP, pode induzir a redução da pressão intradiscal na coluna lombar (Sasaki *et al.*, 2001, Ishikawa *et al.*, 1999). Existem três tipos de lesões discais. Um disco prolapsado é um que está intacto mas saliente. Num disco extruso, o anel fibroso rasgou e o NP migrou, mas está ainda ligado ao disco. Num disco sequestrado, um fragmento do NP soltou-se do disco e está livre dentro do canal espinal. A quimionucleólise é eficaz nos discos prolapsados e extrusos, mas não em lesões sequestradas. Nos Estados Unidos da América, a quimionucleólise está aprovada apenas para utilização na coluna lombar (inferior). Noutros países, tem sido utilizada com sucesso para tratar hérnias cervicais (coluna superior). A quimionucleólise é assim uma alternativa conservativa à cirurgia do disco quando é preferível reduzir a pressão discal.

A composição e estrutura precisas da(s) cadeia(s) de carboidrato numa glicoproteína podem influenciar directamente o seu tempo de vida no soro, uma vez que as células no fígado e no sistema reticuloendotelial podem ligar e internalizar glicoproteínas na circulação com carboidratos específicos. Os hepatócitos têm receptores sobre as suas superfícies que reconhecem cadeias de oligossacárido com resíduos Gal terminais (*i.e.*, na(s) extremidade(s) mais exterior(es) de glicanos em relação ao polipéptido), macrófagos contêm receptores para resíduos GlcNAc ou Man terminais, e hepatócitos e linfócitos têm receptores para resíduos fucose expostos. Não foram porém encontrados quaisquer receptores específicos de ácido siálico. Ainda que algo dependente do arranjo espacial dos oligossacáridos, como regra geral, quanto maior for o número de resíduos açúcar expostos reconhecidos por receptores da superfície celular no fígado e no sistema reticuloendotelial, mais rapidamente uma glicoproteína será depurada do soro. Devido à ausência de receptores específicos de ácido siálico, porém, oligossacáridos com todas as ramificações terminadas, ou "capeadas", com ácido siálico não promoverão a depuração da proteína à qual estão ligados.

A presença e natureza da(s) cadeias(s) de oligossacárido numa glicoproteína podem também afectar propriedades bioquímicas importantes para além do seu reconhecimento por receptores específicos de açúcar em células de fígado e reticuloendoteliais. A remoção do carboidrato de uma

glicoproteína diminuirá usualmente a sua solubilidade, e pode também aumentar a sua susceptibilidade à degradação proteolítica por desestabilização do padrão de dobragem correcto do polipéptido e/ou revelação de locais sensíveis a protease. Por razões similares, o estado de glicosilação de uma proteína pode afectar o seu reconhecimento pelo sistema imunitário.

As sHASEGP podem ser utilizadas para remover células do *cumulus* circundando um ovo antes da criopreservação e de outras técnicas de fertilização *in vitro* tais como injecção de esperma intracitoplásmica (ICSI). A hialuronidase pode ser adicionada a oócitos colhidos entre 10-200 U/ml em soluções salinas tamponadas. Os oócitos são separados das células do *cumulus* libertadas através de aspiração e lavados através de várias lavagens com meios sem hialuronidase. Os ovos podem depois ser processados para criopreservação ou técnicas de IVF.

As sHASEGP são também úteis para a penetração mais eficaz de agentes quimioterapêuticos em tumores sólidos. As sHASEGP podem ser injectadas intratumoralmente com agentes anticancerosos ou intravenosamente para cancros disseminados ou difíceis de alcançar. O agente anticanceroso pode ser um agente quimioterapêutico, um anticorpo, um péptido, ou um vector de terapia génica, vírus ou ADN. Adicionalmente, as sHASEGP podem ser utilizadas para recrutar células de tumor para a *cycling pool* para sensibilização em tumores anteriormente quimio-refractários que adquiriram resistência multicultural a fármacos (St. Croix *et al.* Cancer Lett. 11 Set 1998; 131(1): 35-44). As HASEGP são também úteis para melhorar a entrega de agentes biológicos, tais como anticorpos monoclonais, citoquinas e outros fármacos, a tumores que acumulam glicosaminoglicanos. Muitos tumores apagam genes envolvidos no catabolismo de glicosaminoglicanos pelo que a acumulação localizada pode impedir agentes antineoplásicos e o sistema imunitário de atingir a massa do tumor.

A sHASEGP pode também ser utilizada para aumentar a sensibilidade de tumores que são resistentes a quimioterapia convencional. Numa concretização, sHASEGP é administrada a um paciente possuindo um tumor associado com um defeito LuCa-1 numa quantidade eficaz para aumentar a difusão à volta do local

do tumor (*e.g.*, para aumentar a circulação de factores quimioterapêuticos (*e.g.*, para facilitar a circulação) e/ou as concentrações de agentes quimioterapêuticos no local e à volta do local do tumor), inibir a motilidade de células de tumor (*e.g.*, por degradação de HA) e/ou para diminuir o limiar de apoptose de célula(s) de tumor (*i.e.*, trazer a(s) célula(s) de tumor para um estado de *anoikis*), um estado que torna a(s) célula(s) de tumor mais susceptíveis à acção de agentes quimioterapêuticos ou doutros agentes que podem facilitar a morte celular, preferivelmente facilitar preferencialmente a morte celular programada de células em *anoikis*. Agentes quimioterapêuticos como aqui utilizados pretendem abranger todas as moléculas, sintéticas (*e.g.*, cisplatina) bem como de ocorrência natural (*e.g.*, factor de necrose de tumor), que facilitam a inibição do crescimento de células de tumor, e preferivelmente facilitam, mais preferivelmente facilitam preferencialmente a morte de células de tumor.

É de interesse particular a utilização de sHASEGP para o tratamento de cancros metastáticos e não metastáticos, particularmente cancros metastáticos, possuindo actividade de hialuronidase diminuída a não detectável em relação a células não cancerosas (normais). A sHASEGP pode ser utilizada como um agente quimioterapêutico (sozinho ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos) no tratamento de qualquer de uma variedade de cancros, particularmente tumores invasivos. Por exemplo, a sHASEGP pode ser utilizada no tratamento de carcinoma do pulmão de pequenas células, carcinoma de células escamosas do pulmão, bem como cancros da mama, ovários, cabeça e pescoço, ou qualquer outro cancro associado com níveis deprimidos de hialuronidase ou com um gene LuCa-1 deficiente (hpHAse) (*e.g.*, um gene LuCa-1 que não proporciona a expressão de níveis adequados de hpHAse ou codifica uma hpHAse deficiente que não proporciona um nível adequado de actividade de hialuronidase) ou outro defeito associado com catabolismo de hialuronano diminuído. A sHASEGP é preferível para o tratamento de doenças malignas associadas com catabolismo de HA deficiente uma vez que não requer participação celular para que a degradação ocorra.

A dosagem específica apropriada para administração pode ser facilmente determinada por um técnico competente na

especialidade de acordo com os factores acima discutidos (ver, por exemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine, 11.ª Ed., 1987). Para além disso, as estimativas de dosagens apropriadas em humanos podem ser extrapoladas a partir de determinações do nível de actividade enzimática de sHASEGP *in vitro* e/ou de dosagens eficazes em estudos com animais. Por exemplo, 70-300 TRU de hialuronidase são eficazes na redução da carga do tumor num ratinho scid. Atendendo a esta informação, as dosagens correspondentes num humano médio com 70 kg variarão de cerca de 250 000-1 200 000 TRU de hialuronidase. A quantidade de sHASEGP administrada a um paciente humano está geralmente na gama de 1 TRU a 5 000 000 TRU de actividade enzimática, preferivelmente entre cerca de 1000 TRU e 2 500 000 TRU, mais preferivelmente entre cerca de 100 000 TRU e 1 500 000 TRU, normalmente entre cerca de 250 000 TRU e 1 200 000 TRU, com cerca de 725 000 TRU representando doses prescritas médias.

Numa concretização, uma sHASEGP é formulada numa solução salina 0,15 M contendo sHASEGP numa concentração de cerca de 150 000 TRU/cm^3. A formulação é depois injectada intravenosamente com 15000 TRU/kg de peso corporal do paciente. Alternativamente, a formulação de enzima pode também ser injectada subcutaneamente para permitir à hialuronidase perfundir-se à volta do local do tumor. Numa concretização preferida, a sHASEGP é injectada peritumoralmente ou ao interior da massa de tumor. Noutra concretização preferida, a sHASEGP é formulada como um lipossoma e é entregue por injecção quer intravenosamente quer no local ou na proximidade do local de células cancerosas associadas a um defeito no gene LuCa-1 (hpHAse). A injecção de sHASEGP resulta intravenosamente em sHASEGP no local do tumor. Para além disso, sHASEGP super-sialada é preferível para administração parentérica na medida em os ácidos siálicos terminais na sHASEGP impedem a depuração da enzima a partir da circulação pelo sistema reticuloendotelial. Comparações de sHASEGP super-sialada com hialuronidases de bovino e ovino não sialadas revelam que é conseguida uma farmacocinética substancialmente mais favorável.

FACILITAÇÃO DE TERAPIA GÉNICA

A eficácia da maioria dos veículos de entrega de genes *in vivo* não corresponde à eficácia encontrada *in vitro.* Os glicosaminoglicanos podem impedir a transferência e a difusão

de ADN e de vectores virais para o interior de muitos tipos de células. Os níveis deste material na matriz extracelular podem entravar consideravelmente o processo. Dubensky *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Dez 1984; 81(23):7529-33) demonstraram que, quando combinada com colagenase, a hialuronidase poderá facilitar a transdução de ADN *in vivo.* Foi demonstrado que vírus adeno-associados são também receptivos a terapia génica mediada por hialuronidase (Favre *et al.*, (Gene Ther. Ago 2000; 7(16):1417-20).

Determinámos aqui que são abertos com sHASEGP canais de tamanho definido na matriz extracelular. Estes poros não melhoram a difusão de substâncias com um diâmetro superior a cerca de 200-500 nm. No entanto, moléculas mais pequenas tais como retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados e complexos de ADN são receptivos a difusão mediada por sHASEGP.

Alternativamente, os vírus podem ser armados com o gene de sHASEGP para facilitar a sua replicação e disseminação num tecido alvo por exemplo. O tecido alvo pode ser um tecido canceroso tal que o vírus é capaz de replicação selectiva dentro do tumor. O vírus pode também ser um vírus não lítico caso em que o vírus se replica selectivamente sob um promotor específico do tecido. À medida que os vírus se replicam, a co-expressão de sHASEGP com genes virais facilitará a disseminação do vírus *in vivo.*

Alternativamente, o ácido nucleico de interesse e uma sHASEGP podem ser utilizados simultaneamente ou consecutivamente ou de modo a serem escalonados ao longo do tempo. Simultaneamente refere-se a uma co-administração. Neste caso, estes dois componentes essenciais podem ser misturados para formar uma composição antes de serem administrados, ou podem ser administrados ao mesmo tempo à célula ou ao organismo hospedeiro. É também possível administrá-los consecutivamente, isto é um após o outro, independentemente de qual o componente do produto de combinação que é administrado primeiro. Finalmente, é possível utilizar um modo de administração que é escalonado ao longo do tempo ou é intermitente e que pára e recomeça a intervalos que podem ser ou não regulares. É salientado que as vias e locais de administração dos dois componentes podem ser diferentes. De acordo com uma

concretização particularmente preferida, a sHASEGP é administrada antes do ácido nucleico, com a via de administração dos dois componentes sendo preferivelmente similar. O intervalo de tempo entre as injecções não é crítico e pode ser definido pelo técnico competente. É possível recomendar um intervalo de 10 min a 72 h, vantajosamente de 30 min a 48 h, preferivelmente de 1 a 24 h e, muito preferivelmente, de 1 a 6 h.

Adicionalmente, o produto de combinação pode também ser combinado com uma ou mais moléculas que se destinam a melhorar a administração de ácido nucleico. As moléculas podem ser moléculas que têm um efeito protector sobre o ácido nucleico (protecção em relação à degradação na célula), que melhoram a sua penetração ou a sua expressão na célula hospedeira (péptido fusogénico, sinal de localização nuclear, etc.), que possibilitam a um tipo de célula particular ser visado (ligando ou anticorpo que reconhecem uma proteína na superfície celular, etc.), ou que prolongam o efeito terapêutico (agente imunossupressor, etc.). O produto de combinação pode também ser combinado com agentes que facilitam a transfecção (proteínas, etc.).

O produto de combinação pode ser preparado com vista à administração local ou parentérica ou à administração pela via digestiva. Vias que podem ser mencionadas em particular são as vias intragástrica, subcutânea, intracardíaca, intravenosa, intraperitoneal, intra-sinovial, intratumoral, intrapulmonar, intranasal e intratraqueal, e, muito particularmente, a via intramuscular. A administração pode ser efectuada por meio de qualquer técnica da especialidade (injecção, via oral, aerossol, instilação, etc.), como uma dose única ou como uma dose que é repetida uma ou várias vezes após um intervalo de tempo particular. A via de administração pode ser ajustada para se adequar ao gene de interesse a ser transferido e à doença a ser tratada. A formulação pode incluir veículos farmaceuticamente aceitáveis (excipientes, adjuvantes, etc.). A substância conduzindo à desorganização da matriz extracelular e o ácido nucleico de interesse são preferivelmente dissolvidos num tampão que é adequado para utilização farmacêutica e que pode ser hipertónico, hipotónico ou isotónico. Vários tampões podem ser considerados. Aqueles que podem ser mencionados como ilustração são uma solução salina fisiológica (NaCl a 0,9%),

uma solução salina não fisiológica (NaCl a 1,8%), uma solução Hepes-Ringer, uma solução Lactato-Ringer, um tampão que é baseado em Tris-HCl (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 a 8, EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 a 8, $MgCl_2$ 1 mM), um tampão de fosfato (tampão em H_2O de fosfato de Krebs), uma solução de açúcar (glucose, sacarose, trealose, etc.), ou simplesmente água.

HIPODERMOCLISE

A hipodermoclise, a perfusão subcutânea de fluidos, é uma técnica de hidratação útil e fácil adequada para pacientes adultos ligeiramente a moderadamente desidratados, especialmente os idosos. O método é considerado seguro e não coloca quaisquer complicações graves. O efeito adverso mais frequente é um edema subcutâneo ligeiro que pode ser tratado por massagem local ou diuréticos sistémicos. Aproximadamente 3 L podem ser dados num período de 24 horas em dois locais separados. Os locais de perfusão comuns são o peito, abdómen, coxas e parte superior dos braços. A solução preferida é solução salina normal, mas podem também ser utilizadas outras soluções, tais como solução salina semi-normal, glucose com solução salina ou glucose a 5 por cento. Se necessário, pode-se adicionar cloreto de potássio ao saco de solução. Adicionalmente, outros fármacos podem ser entregues através de vias similares. Pode-se adicionar sHASEGP humana para melhorar a absorção de fluido e aumentar a velocidade global de administração. A sHASEGP humana é preferível para hipodermóclise repetida em relação a enzimas com origem no matadouro, pelo facto de não ser provavelmente imunogénica como se sabe que a enzima bovina será. Pode ser administrada em casa por membros da família ou por uma enfermeira; a técnica deverá ser familiar de todos os médicos de família.

Em pacientes de ambulatório, locais de hipodermoclise incluem o abdómen, parte superior do peito, acima da mama, sobre um espaço intercostal e a área escapular. Em pacientes acamados, locais preferidos são as coxas, o abdómen e a zona exterior da parte de cima do braço. Após um a quatro dias, a agulha e tubagem deverão ser trocadas, ainda que conjuntos de perfusão tenham sido deixados colocados durante períodos muito mais longos sem complicações. Pode também ser aplicada a administração de bólus de 500 mL durante uma ou duas horas três

vezes ao dia, com 150 U de sHASEGP administrados no local subcutâneo antes da perfusão da primeira manhã.

FACILITAÇÃO DE INJECÇÕES TERAPÊUTICAS

Muitas moléculas injectadas percutaneamente atingem a circulação lentamente ou com uma eficiência muito baixa. Vários factores regulam a farmacocinética e a farmacodinâmica de moléculas injectadas subcutaneamente (SC) ou intramuscularmente (IM). Geralmente, moléculas maiores atingem a circulação mais lentamente e menos eficientemente sem transporte activo para a circulação. A biodisponibilidade subcutânea é determinada calculando a razão das áreas sob as curvas para administração SC *versus* administração intravenosa ($AUC_{SC}/AUC_{intravenosa}$). Um segundo factor é a carga e a afinidade por moléculas da matriz que podem desempenhar um papel na sequestração de moléculas subcutaneamente. Se estes materiais forem degradados localmente podem nunca atingir os seus alvos desejados e assim demonstram uma biodisponibilidade sistémica global diminuída para os órgãos alvo.

Proteínas grandes são normalmente dadas intravenosamente tal que o medicamento fica directamente disponível na corrente sanguínea. Seria no entanto vantajoso se um medicamento pudesse ser dado subcutaneamente, intramuscularmente ou intradermicamente, uma vez que estas formas de administração são muito mais fáceis de aceitar pelo paciente. Especialmente, se o medicamento tem de ser tomado regularmente durante toda a vida e se o tratamento é iniciado precocemente, ainda quando o paciente é uma criança. Contudo, um medicamento com uma molécula muito grande e lábil, tal como o factor de coagulação VIII de 170 a 300 kDa, tem normalmente uma biodisponibilidade muito baixa se dado subcutaneamente, intramuscularmente ou intradermicamente, uma vez que a absorção não é suficiente e a degradação é severa.

Para além da necessidade de aumentar a biodisponibilidade de muitos agentes biológicos administrados subcutaneamente, uma farmacocinética mais rápida é também criticamente importante em casos de medicina de emergência. O tempo requerido para atingir o acesso intravenoso em muitos pacientes pode impedir a utilização de um fármaco que é de outro modo de actuação rápida

quando administrado sistemicamente. Nalguns casos, o fracasso em conseguir o acesso intravenoso é depois seguido por injecção subcutânea, o que conduz a um atraso adicional em atingir os órgãos alvo. Assim, a disponibilidade mais rápida de fármacos subcutâneos seria benéfica, como uma primeira linha de tratamento, em vez do risco do tempo requerido para atingir o acesso intravenoso. Exemplos de moléculas que podem ser entregues subcutaneamente bem como intravenosamente incluem epinefrina, atropina, narcan, lenhocaína e dextrose.

Muitas moléculas injectadas percutaneamente atingem a circulação lentamente ou com uma eficiência muito baixa. Vários factores regulam a farmacocinética e a farmacodinâmica de moléculas injectadas subcutaneamente (SC) ou intramuscularmente (IM). Geralmente, moléculas maiores atingem a circulação mais lentamente e menos eficientemente sem transporte activo para a circulação. A biodisponibilidade subcutânea é determinada calculando a razão das áreas sob as curvas para administração SC *versus* administração intravenosa ($AUC_{SC}/AUC_{intravenosa}$). Um segundo factor é a carga e a afinidade por moléculas de matriz que podem desempenhar um papel na sequestração de moléculas subcutaneamente. Se estes materiais forem degradados localmente podem nunca atingir os seus alvos desejados e assim demonstram uma biodisponibilidade sistémica global diminuída para os órgãos alvo.

Proteínas grandes são normalmente dadas intravenosamente tal que o medicamento fica directamente disponível na corrente sanguínea. Seria no entanto vantajoso se um medicamento pudesse ser dado subcutaneamente, intramuscularmente ou intradermicamente, uma vez que estas formas de administração são muito mais fáceis de aceitar pelo paciente, especialmente, se o medicamento tem de ser tomado regularmente durante toda a vida e se o tratamento é iniciado precocemente, ainda quando o paciente é uma criança. Contudo, um medicamento com uma molécula muito grande e lábil, tal como factor coagulação VIII de 170 a 300 kDa, tem normalmente uma biodisponibilidade muito baixa se dado subcutaneamente, intramuscularmente ou intradermicamente, uma vez que a absorção não é suficiente e a degradação é severa.

Para além da necessidade de aumentar a biodisponibilidade de muitos agentes biológicos administrados subcutaneamente, uma

farmacocinética mais rápida é também criticamente importante em casos de medicina de emergência. O tempo requerido para atingir o acesso intravenoso em muitos pacientes pode impedir a utilização de um fármaco que é de outro modo de actuação rápida quando administrado sistemicamente. Nalguns casos, o fracasso em atingir o acesso intravenoso é depois seguido por injecção subcutânea, o que conduz a um atraso adicional em atingir os órgãos alvo. Assim, a disponibilidade mais rápida de fármacos subcutâneos seria benéfica, como uma primeira linha de tratamento, em vez do risco do tempo requerido para atingir o acesso intravenoso. Exemplos de moléculas que podem ser entregues subcutaneamente bem como intravenosamente incluem epinefrina, atropina, narcan, lenhocaína e dextrose.

Um benefício adicional do invento reside na capacidade para entregar volumes equivalentes ou superiores de soluções SC ou IM sem a dor e a morbidez associadas com a pressão e o volume da solução no local de injecção.

HEMORRAGIA VÍTREA

Num esforço para minimizar o potencial para causar descolamento adicional ou rasgo da retina durante o desempenho de vitrectomia, foi anteriormente proposto na Patente dos U.S. N.º 5292509 (Hageman) injectar certas enzimas glicosaminoglicanase isentas de protease no interior do corpo vítreo, para fazer com que o corpo vítreo fique desligado ou "desinserido" da retina, antes da remoção do corpo vítreo. É suposto que esta desinserção ou desligamento do corpo vítreo minimiza a probabilidade da ocorrência de rasgo ou descolamento adicionais da retina à medida que o corpo vítreo é removido. Exemplos de enzimas glicosaminoglicanase isentas de protease específicas, que podem ser úteis para conseguir esta desinserção vítrea, incluem supostamente; condroitinase ABC, condroitinase AC, condroitinase B, condroitina 4-sulfatase, condroitina 6-sulfatase, hialuronidase e beta-glucuronidase.

Ainda que a enzima hialuronidase seja conhecida como utilizável para várias aplicações oftálmicas, incluindo a aplicação auxiliar da vitrectomia descrita Patente U.S. N.º 5292509, estudos publicados mostraram que a enzima hialuronidase pode ela própria ser tóxica para a retina e/ou

para outras estruturas anatómicas do olho. Ver, The Safety of Intravitreal Hyaluronidase; Gottleib, J. L.; Antoszyk, A. N., Hatchell, D. L. e Soloupis, P., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 31:11, 2345-52 (1990). Para além disso, a utilização de preparações impuras de hialuronidase de matadouro pode causar uveíte ou inflamação do olho. A utilização de sHASEGP humana é assim preferível pela sua potência aumentada, pureza e ausência de origem animal, o que pode dar origem a reacções imunogénicas e a neutralização mediada por anticorpo após administração repetida. Noutra concretização, uma forma peguilada de uma sHASEGP pode ser injectada no olho. Uma tal sHASEGP peguilada não é depurada do vítreo de um modo tão rápido e mantém a sua actividade no vítreo durante um período de tempo mais longo.

A toxicidade oftálmica de algumas preparações de hialuronidase tem sido confirmada por outros investigadores, que têm proposto que tais preparações de hialuronidase sejam utilizadas como um irritante tóxico para causar neovascularização do olho induzida experimentalmente, em modelos de toxicidade animal (ver An Experimental Model of Preretinal Neovascularization in the Rabbit; Antoszyk, A. N., Gottleib, J. L., Casey, R C., Hatchell, D. L. e Machemer, R., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32:1, 46-51 (1991)). A utilização de uma sHASEGP altamente purificada, desprovida de contaminantes à base de mercúrio e derivados de gado ou bactérias, é preferível para procedimentos intra-oculares. Para além disso, uma sHASEGP humana recombinante é preferível em relação a preparações derivadas de matadouro, não só em termos de pureza com ausência de patogénios de bovino mas também pelo risco reduzido de imunogenicidade. Muito preferivelmente, perspectivada uma sHASEGP peguilada.

É assim proporcionado um método enzimático utilizando uma sHASEGP humana para tratamento de distúrbios oftálmicos do olho de mamífero. Numa concretização do invento, a referida sHASEGP é PEGuilada para prolongar a sua permanência dentro do vítreo e prevenir a absorção localizada. A prevenção de neovascularização, e a taxa de depuração aumentada a partir do vítreo de materiais tóxicos para a retina, são conseguidos por administração de uma quantidade de hialuronidase eficaz para liquefazer o humor vítreo do olho tratado, sem causar lesões tóxicas ao olho. A liquefacção do humor vítreo aumenta a taxa

de permuta de líquido a partir da câmara vítrea. Este aumento na permuta remove aqueles materiais e condições cuja presença causa lesões oftalmológicas e retinianas.

UTILIZAÇÕES COSMÉTICAS DE sHASEGP

É conhecido que a hialuronidase tem o efeito de despolimerizar as longas cadeias de mucopolissacárido da substância fundamental, responsável pela retenção de água ligada e pelo abrandamento, por compressão capilar, da difusão de líquidos orgânicos, que elimina resíduos metabólicos. Esta retenção de água e resíduos, associada à sobrecarga de gordura dos lipócitos, constitui os clássicos edema de "pele de porco" ou edema "de casca de laranja". Esta despolimerização cortará desse modo as longas cadeias de mucopolissacáridos em cadeias mais curtas, e por isso a eliminação da água ligada, de resíduos, restauração da circulação venosa e linfática e desaparecimento do edema local.

A utilização de sHASEGP através de administração subcutânea é assim preferida para a remoção de glicosaminoglicanos envolvidos na acumulação da assim denominada celulite e para promover o fluxo linfático. A sHASEGP humana é preferida para o tratamento de celulite porque é capaz de remover os referidos glicosaminoglicanos, sem os componentes inflamatórios de proteínas derivadas de matadouro, e é de elevada pureza e não é provavelmente imunogénica. A sHASEGP pode ser administrada através de injecções subcutâneas repetidas, através de entrega transdérmica na forma de pomadas ou cremes ou através da utilização de formulações de libertação retardada injectáveis para promover a degradação contínua de glicosaminoglicanos e impedir o seu retorno.

TRANSPLANTAÇÃO DE ÓRGÃOS

O hialuronano tem vários efeitos biológicos, que estão em parte relacionados com o seu tamanho molecular (West, D.C., Kumar, S. Exp. Cell. Res. 183, 179-196, 1989). O teor em hialuronano num órgão aumenta em diferentes condições de inflamação desse órgão. Assim, uma concentração aumentada de hialuronano tem sido observada em tecido de diferentes órgãos caracterizado por lesão inflamatória-imunológica tal como

alveolite (Nettelbladt O. *et al.*, Am. Rev. Resp. Dis. 1989; 139: 759-762) e enfarte do miocárdio (Waldenstrom *et al.*, J. Clin. Invest. 1991; 88(5): 1622-1628). Outros exemplos são rejeição de aloenxerto após uma transplantação renal (Hällgren *et al.*, J. Exp. Med. 1990a; 171: 2063-2076; Wells *et al.*, Transplantation 1990; 50: 240-243), do intestino delgado (Wallander *et al.*, Transplant Int. 1993; 6: 133-137) ou cardíaca (Hällgren *et al.*, J. Clin. Invest. 1990b; 85: 668-673); ou uma inflamação miocárdica de origem viral (Waldenstrdm *et al.*, Eur. J. Clin. Invest. 1993; 23: 277-282).

A ocorrência de edemas intersticiais em associação com o enxerto de um órgão constitui um problema grave no campo da cirurgia de transplantação. Até 25% dos enxertos incharão num grau tal que a função perder-se-á temporariamente. Além disso, em 2-3% dos casos, a inchação causa ruptura do rim, resultando numa hemorragia maciça.

A sHASEGP pode ser utilizada para degradar glicosaminoglicanos acumulados num transplante de órgão. A remoção destes glicosaminoglicanos promove a remoção de água a partir do enxerto e assim a função do órgão. Pode ser administrada uma dose na gama de 500-10000 Unidades/kg para reduzir deste modo a pressão intersticial.

ACUMULAÇÕES PATOLÓGICAS DE GLICOSAMINOGLICANOS NO CÉREBRO

Os níveis de hialuronano estão elevados em várias condições patológicas cerebrospinais. Os níveis de hialuronano cerebrospinal são normalmente inferiores a 200 µg/L em adultos (Laurent *et al.*, Acta Neurol. Scand. Set 1996; 94(3):194-206). Estes níveis podem-se elevar até mais de 8000 µg/L em doenças tais como meningite, estenose espinal, lesões do crânio e enfarte cerebral. Assim, a administração de sHASEGP, quer por entrega intratecal quer por injecção sistémica de sHASEGP super-sialada, pode ser utilizada para degradar níveis de substrato criticamente elevados.

A falta de vasos linfáticos eficazes no cérebro pode também conduzir a edema com ameaça para a vida após traumatismo craniano. A acumulação de hialuronano é um resultado de síntese aumentada por HA-sintases, e de degradação diminuída. A

acumulação de hialuronano serve o propósito de aumentar o teor em água no tecido danificado para facilitar a extravasação de leucócitos mas pode ser letal. A administração de sHASEGP humana a um paciente padecendo de traumatismo craniano pode assim remover a acumulação de hialuronano no tecido e a água associada com este. A sHASEGP humana pode ser administrada intratecalmente através de um *shunt* ou, alternativamente, sHASEGP super-sialada pode ser administrada intravenosamente para atingir o tecido do cérebro.

Após isquemia do cérebro como ocorre no acidente vascular cerebral, o teor em hialuronano aumenta dramaticamente devido à expressão aumentada de HA-sintases e catabolismo diminuído. A falência de bombas de iões e o derrame de plasma para o interstício resulta em retenção de fluido que não é correctamente depurado pelos vasos linfáticos, e resulta em necrose de tecido. Alguns grupos têm tentado impedir a acumulação de fluido intersticial após isquemia-reperfusão por bloqueio da permeabilidade vascular. No entanto, assim que o fluido é extravasado, o impedimento da permeabilidade vascular pode impedir a resolução de edema e exacerbar as condições.

A sHASEGP humana pode também ser utilizada no tratamento de edema associado a tumores do cérebro, particularmente o associado a glioblastoma multiforme. O edema associado a tumores do cérebro resulta da acumulação de hialuronano nas porções não cancerosas do cérebro adjacentes ao tumor. A administração de hialuronidase aos locais de acumulação de hialuronano (*e.g.*, por injecção intravenosa ou através de um *shunt*) pode aliviar o edema associado a estas doenças malignas por degradação do hialuronano em excesso nestes locais. Assim, a hialuronidase é bem sucedida no tratamento de tumores do cérebro não apenas na redução da massa de tumor e na inibição do crescimento e/ou metástase do tumor, mas é também útil no alívio do edema associado à doença maligna. A sHASEGP humana pode ser administrada para tratamento de edema de um modo similar ao utilizado para administração de hialuronidase testicular de bovino para tratar edema (ver, *e.g.*, Sa Earp Arq. Braz. Med. 44:217-20).

TRATAMENTO DA ACUMULAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANO NA DOENÇA CARDIOVASCULAR

Foi mostrado que a administração de hialuronidase em modelos animais após enfarte miocárdico experimental pode reduzir o tamanho do enfarte (Maclean, *et al.*, Science, 8 Out 1976; 194(4261):199-200). O mecanismo proposto pelo qual a hialuronidase bovina reduz o tamanho do enfarte em animais é por redução da acumulação de hialuronano que ocorre após isquemia-reperfusão. Crê-se que a redução do tamanho do enfarte decorre da drenagem linfática aumentada, de oxigenação de tecido aumentada e de redução do teor em água miocárdico. Embora o tamanho de enfarte reduzido possa ser obtido em modelos animais, os benefícios não foram alcançados em estudos clínicos mais vastos em humanos. A hialuronidase de testículo de bovino possui uma meia-vida no soro invulgarmente curta de aproximadamente 3 minutos em animais e no ser humano (Wolf, *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. Ago 1982; 222(2):331-7). Esta meia-vida curta é devida aos resíduos manose terminais que são facilmente reconhecidos pelos receptores *scavenger* do sistema reticuloendotelial. Embora animais pequenos possam beneficiar da hialuronidase, devido a um leito vascular mais pequeno, é necessária uma enzima com meia-vida aumentada. A sHASEGP super-sialada possui uma farmacocinética mais favorável devido à sialação para a qual não existe qualquer receptor *scavenger*. A sHASEGP super-sialada em doses na gama de 100-200 000 Unidades/kg pode ser utilizada para facilitar a resolução de hialuronano em excesso após isquemia-reperfusão e para reduzir o tamanho do enfarte.

A sHASEGP super-sialada pode também ser utilizada para limitar placas coronárias da arterioesclerose. Estas placas acumulam glicosaminoglicanos e medeiam a adesão de macrófagos e de células-espuma (Kolodgie *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1 Out 2002; 22(10):1642-8). A administração de sHASEGP super-sialada pode ser utilizada para reduzir a formação de placa. Como a administração repetida de hialuronidase é contemplada em doses de 100-100 000 Unidades/kg, a necessidade de utilizar uma proteína humana recombinante com baixo risco de imunogenicidade e meia-vida aumentada resultará numa redução de placas superior.

TRATAMENTO DE NECROSE DE TECIDO PERIFÉRICO

A necrose de tecido ocorre em muitas doenças devido a insuficiência venosa. A falta de oxigenação suficiente é um dos principais obstáculos à regeneração do tecido. Foi demonstrado que o tratamento com hialuronidase intra-arterial melhora significativamente o quadro clínico em pacientes com doença oclusiva arterial periférica (Elder *et al.*, Lancet (1980) 648-649). Pode-se injectar sHASEGP intra-arterialmente 3-5 vezes por semana em doses de 10-200 000 Unidades.

MELHORIA DE ANESTESIA

A hialuronidase derivada de matadouro é habitualmente utilizada para bloqueio peribulbar em anestesia local antes da cirurgia oftálmica. A presença da enzima evita a necessidade de bloqueios adicionais e acelera o tempo até o aparecimento de aquinesia (perda de movimento ocular). O bloqueio peribulbar e subtenoniano são as aplicações mais comuns de hialuronidase para procedimentos oftálmicos. Desde a descontinuação de Wydase®, têm sido noticiados relatos de diplopia e ptose aumentadas com o bloqueio peribulbar (Brown *et al.* J. Cataract Refract. Surg. 1999; 25:1245-9).

Com a descontinuação pela Wyeth da Wydase®, material de hialuronidase derivado de testículo de bovino é agora fornecido por farmácias de manipulação. No entanto, existem várias preocupações com a utilização de um produto estéril manipulado extemporaneamente. http://www.ashp.org/shortage/hialuronidase.cfm?cfid=11944667&CFToken=942 6953 - ref#ref. Preparações manipuladas não são produtos aprovados pela FDA. Como tal, a FDA não tem qualquer controlo sobre a qualidade ou consistência do processo de fabricação.

A sHASEGP a partir de 10-500 Unidades pode ser misturada directamente com 5 ml de lidocaína a 2% (xilocaína), 5 ml bupivacaína a 0,5% (marcaína) e opcionalmente com epinefrina 1:200,000. A sHASEGP pode ser utilizada para aumentar o aparecimento de aquinesia e para eliminar a necessidade de bloqueios adicionais. A sHASEGP é também ideal para aquinesia para cirurgia cosmética em blefaroplastias e *lifts* faciais. A sHASEGP pode também ser utilizada após aqueles procedimentos

cirúrgicos para difundir anti-inflamatórios e para reduzir o inchaço do tecido.

A sHASEGP pode também ser misturada com uma solução tampão, tal como bicarbonato, para prevenir o desconforto durante o procedimento de injecção. A sHASEGP pode também ser misturada com anestesia para lacerações não só para reduzir o volume total de material requerido para injecção mas também para reduzir a dor do inchaço de tecido.

REDUÇÃO DA PRESSÃO INTRA-OCULAR

Um efeito secundário comum que ocorre em pacientes de catarata no pós-operatório é uma elevação precoce significativa, e ocasionalmente prolongada, na pressão intra-ocular. Uma tal condição é por vezes grave, especialmente em pacientes com alterações no disco óptico glaucomatoso. Ainda que o aumento de pressão tenda a ser mais grave quando são injectados agentes viscoelásticos, tais como ácido hialurónico, no olho durante a cirurgia, a pressão intra-ocular pode-se tornar elevada no pós-operatório mesmo quando estes agentes não são utilizados. Além disso, um tal aumento de pressão pode ocorrer, mesmo quando não são utilizadas quaisquer medicações adicionais durante o procedimento cirúrgico. Nalguns casos, é vantajoso deixar um agente viscoelástico no olho, o que frequentemente torna necessário administrar aos pacientes grandes doses de inibidores de anidrase carbónica. Estes inibidores diminuem a pressão intra-ocular diminuindo a formação de humor aquoso, um fluido que é normalmente segregado no olho, pelo corpo ciliar. Métodos actuais para alívio de aumentos de pressão pós-operatórios no olho incluem vários tipos de gotas oculares tais como agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, agentes simpatomiméticos, mióticos, agentes selectivos alfa II, inibidores de anidrase carbónica e agentes de prostaglandina.

Um método preferido de remoção do viscoelástico tal como ácido hialurónico é por injecção de sHASEGP durante ou imediatamente após procedimentos cirúrgicos do segmento anterior ou do segmento posterior, ainda que sejam também possíveis outros métodos de administração conhecidos na especialidade. Se o ácido hialurónico e a sHASEGP são administrados por injecção na câmara anterior, durante

procedimentos cirúrgicos oculares do segmento anterior, prefere-se permitir que o ácido hialurónico actue como um espaçador durante o início do procedimento cirúrgico. Nalguns casos de transplantação da córnea, a combinação de ácido hialurónico e sHASEGP pode ser colocada na superfície das estruturas intra-oculares antes da suturação do transplante corneano no devido lugar. Esta combinação pode também ser utilizada em cirurgia do segmento posterior, tal como cirurgia da retina ou do vítreo.

Nalguns casos, pode ser aconselhável deixar um agente viscoelástico tal como Healon™, Viscoat™, ou outras substâncias para ocupação de espaço na câmara anterior do olho na conclusão da cirurgia. Isto é especialmente verdade em elevação de pressão positiva, quando os conteúdos intra-oculares tendem a vir para a frente e pressionar contra a superfície posterior da córnea. Se isto ocorre num olho com uma lente intra-ocular sintética colocada, a pressão sobre o endotélio corneano pode causar danos significativos nas células e podem ocorrer inchaço corneano e opacificação subsequentes, que estão associados com visão diminuída. Tipicamente, se a pressão intra-ocular de um paciente é significativamente elevada na conclusão do procedimento operatório, é necessário dar a este paciente grandes doses de inibidores de anidrase carbónica, bem como gotas oculares tópicas, tais como bloqueadores beta e agonistas alfa II, de modo a diminuir a formação aquosa e/ou a aumentar o fluxo aquoso. Estes agentes têm todos efeitos secundários significativos e, em alguns casos, são contra-indicados em pacientes com vários tipos de condições médicas, tais como problemas respiratórios, doença cardíaca ou pressão sanguínea elevada. No entanto, a utilização de sHASEGP nestas situações eliminará a necessidade de administrar a estes pacientes grandes doses desses fármacos.

Adicionalmente, existe uma quantidade significativa de ácido hialurónico na rede trabecular. A sHASEGP quebrará esta e por isso melhorará o fluxo do aquoso através da rede trabecular. Portanto, a pressão intra-ocular do paciente diminuirá. A combinação de sHASEGP com outros agentes da câmara anterior, tais como uma metilcelulose (Ocucoat®, por exemplo, disponível comercialmente na Storz Instrument Co.), utilizados como espaçadores e/ou agentes protectores em cirurgia de

catarata, será também eficaz na prevenção de elevações de pressão significativas, porque abrirá de facto a rede trabecular e permitirá maior drenagem de humor aquoso quebrando uma quantidade significativa do ácido hialurónico presente na rede trabecular.

A remoção de glicosaminoglicanos da rede trabecular é também útil para a redução da pressão intra-ocular em indivíduos padecendo de glaucoma de ângulo aberto. A sHASEGP humana pode ser administrada por injecção subconjuntival directamente na câmara anterior.

CISTOS GANGLIONARES

O cisto ganglionar (também conhecido como cisto do pulso, cisto da Bíblia ou cisto de tendão dorsal) é a massa de tecido mole mais comum da mão. É um saco cheio de fluido que se pode sentir debaixo da pele. Está usualmente ligado a uma bainha de tendão (revestimento que lubrifica o tendão) na mão ou pulso ou ligado a uma articulação subjacente; no entanto, alguns não têm qualquer conexão óbvia com quaisquer estruturas. Estes podem também ocorrer no pé. Isto ocorre muitas vezes quando existe uma ruptura nos ligamentos sobrejacentes do revestimento de tendões ou articulações e o revestimento forma uma hérnia para fora do defeito ligamentoso, causando um inchaço sob a pele. Porque existe frequentemente inflamação associada, o tecido inflamado produz um fluido gelatinoso que enche o saco protuberante. Podem ser duros como pedra devido à uma elevada pressão do fluido mucoso contido dentro do cisto, e são frequentemente confundidos com uma proeminência óssea.

A sHASEGP pode ser utilizada para melhorar os cistos ganglionares. A injecção intralesional de sHASEGP de 5-1000 Unidades seguida por aspiração com uma agulha fina removerá o cisto sem a necessidade de cirurgia. Opcionalmente, podem também ser injectados corticoesteróides com a sHASEGP. Uma injecção pode ser requerida para alguns pacientes.

MIXEDEMA

A infiltração de glicosaminoglicano (GAG) da pele é uma particularidade de hipertiroidismo, hipotiroidismo, mixedema pretibial, escleromixedema e escleredema. O ácido hialurónico

é o principal GAG em todas as condições e em pele normal. Existe uma variabilidade histológica mínima da distribuição dérmica de GAG. As mucinoses cutâneas adquiridas exibem distribuição de GAG na pele e composição bioquímica similares. As diferenças morfológicas em actividade fibroblástica sugerem que as mucinoses de escleredema e escleromixedema representam um processo local, enquanto a infiltração de GAG de doenças da tiróide pode ter uma origem sistémica. Estes distúrbios podem ser melhorados com uma sHASEGP através de uma via de administração não só local mas também sistémica. Para terapia crónica, pode ser perspectivada uma sHASEGP PEGuilada.

UTILIZAÇÕES PULMONARES DE sHASEGP

Os níveis de hialuronano em lavagens broncoalveolares (LBA) a partir de indivíduos normais são geralmente inferiores a 15 ng/ml. No entanto, os níveis na LBA sobem dramaticamente em condições de dificuldade respiratória (Bjermer, Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.) 3 Out 1987; 295(6602): 803-6). Na ARDS, por exemplo, os níveis de hialuronano podem aumentar até 500 ng/ml enquanto no pulmão do agricultor, os níveis na LBA podem ultrapassar os 1000 ng/ml (Hallgren *et al.*, Am. Rev. Respir. Dis. Mar 1989; 139(3):682-7), (Larrson *et al.* Chest. Jan 1992; 101(1):109-14). O hialuronano aumentado no pulmão pode impedir a difusão de oxigénio e a permuta gasosa, bem como a activação de respostas de neutrófilos e macrófagos.

Preparações de hialuronidase bovina não são preferíveis para o tratamento destas condições por várias razões. Em primeiro lugar, é conhecido que preparações de hialuronidase derivadas de testículo de matadouro estão contaminadas com serina-proteases tais como acrosina. Em segundo lugar, a natureza estranha das enzimas bovinas aumenta a probabilidade de uma reacção anafiláctica, o que poderá resultar em morte do paciente. Assim, uma preparação altamente purificada de sHASEGP humana recombinante pode ser entregue por entrega quer pulmonar quer intravenosa. A sHASEGP humana pode também ser administrada a pacientes padecendo de outras complicações pulmonares que estão associadas com glicosaminoglicanos elevados ou para melhorar a entrega de outras moléculas co-entregues ao pulmão.

O invento será agora descrito em maior detalhe por referência aos exemplos não limitativos seguintes.

EXEMPLO 1

ENSAIOS DE HIALURONIDASE BASEADOS EM MICROTITULAÇÃO

O exemplo seguinte proporciona um rápido ensaio para medição da actividade de hialuronidase de sHASEGP. Este ensaio pode ser relacionado com a TRU, a IU ou NFU através da utilização de uma preparação de hialuronidase padrão da W.H.O..

ENSAIO DE MICROTITULAÇÃO DE HIALURONANO BIOTINILADO

Os grupos carboxilo livres nos resíduos ácido glucurónico de hialuronano são biotinilados num passo de reacção utilizando biotina-hidrazida (Pierce), sulfo-NHS (Pierce) e 1-etildimetilaminopropilcarbodiimida (Sigma). Este substrato de HA biotinilado é acoplado covalentemente a uma placa de microtitulação de 96 poços numa segunda reacção. Após a reacção enzimática estar completa, o substrato residual é detectado com uma reacção de avidina-peroxidase que pode ser lida num leitor de placas ELISA padrão. Como o substrato está ligado covalentemente à placa de microtitulação, não ocorrem artefactos tais como deslocamento dependente do pH do substrato biotinilado. A sensibilidade permite a medição rápida da actividade de hialuronidase a partir de células cultivadas e de amostras biológicas com uma variação inter-ensaios inferior a 10%.

a. Protocolo

PREPARAÇÃO DE SUBSTRATO DE HA BIOTINILADO

Dissolveram-se 100 mg de HA (Sigma Chemicals) em MES 0,1 M, pH 5,0, até uma concentração final de 1 mg/ml e deixaram-se dissolver durante pelo menos 24 h a 4°C antes do acoplamento de biotina. Adicionou-se sulfo-NHS (Pierce; Rockford IL) à solução de CS04 MES até uma concentração final de 0,184 mg/ml. Dissolveu-se biotina-hidrazida (Pierce) em DMSO como uma solução de reserva 100 mM e adicionou-se à solução CS04 até uma concentração final de 1 mM. Preparou-se uma solução de reserva de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) como uma solução de reserva 100 mM em água destilada e adicionou-se à solução de HA-biotina numa concentração final de 30 mM. Deixou-se esta solução agitar de um dia para o outro a 4°C. Removeram-

se a biotina não ligada e a EDAC por diálise contra água com 3 mudanças de um volume de água de 1000x. O HA biotinilado (bHA) dialisado foi colocado em partes alíquotas e armazenado -20°C durante até vários meses.

Diluiu-se sulfo-NHS até 0,184 mg/ml em água com o bHA numa concentração de 0,2 mg/ml e pipetou-se para placas COVALINK-NH de 96 poços (NUNC; Placerville NJ) com 50 µl por poço. Diluiu-se EDAC até 0,123 mg/ml em água e pipetou-se para as placas COVALINK-NH com a solução de bHA resultando numa concentração final de 10 µg/poço de bHA e 6,15 µg/poço de EDAC. Incubaram-se as placas de um dia para o outro a 4°C ou durante 2 h a 23°C, o que deu resultados comparáveis. Após imobilização covalente de bCS04 sobre as placas de microtitulação, removeu-se a solução de acoplamento sacudindo as placas e lavaram-se 3 vezes em PBS contendo NaCl 2 M e $MgSO_4$ 50 mM (Tampão A). As placas poderão ser armazenadas a 4°C durante até uma semana.

Equilibraram-se as placas COVALINK-NH com bHA imobilizado com 100 µl/poço de tampão de ensaio - quer formato 0,1 M, pH 3,7, NaCl 0,1 M, 1% de detergente TRITON X-100, sacarolactona 5 mM para hialuronidase lisossómica; quer Hepes 10 mM pH 7,4 com $CaCl_2$ 1 mM e albumina de soro humano (ICN) 1 mg/ml para enzimas activas em meio neutro. Foi gerado um conjunto de padrões para a calibração da actividade enzimática em função das "Unidades de Redução da Turvação relativas" (rTRU) por diluição de hialuronidase testicular de bovino (Sigma Type VI-S) em tampão de enzima activa em meio neutro de 1,0 a 1×10^{-6} rTRU/poço e ensaio de 100 µl/poço em triplicado. Diluíram-se amostras de hialuronidase activa em meio ácido em tampão de ensaio lisossómico de 1:10 a 1:130000 e pipetaram-se em triplicado 100 µl/poço. Para a maioria dos ensaios de extractos de tecido e de plasma humano, uma incubação de 30 min a 37°C foi suficiente. Incluíram-se poços de controlo positivos e negativos (sem enzima ou sem ABC (ver abaixo), respectivamente) em triplicado.

A reacção foi terminada pela adição de 200 µl/poço de guanidina.HCl 6 M seguindo-se três lavagens de 300 µl/poço com PBS, NaCl 2 M, $MgSO_4$ 50 mM, 0,05% de detergente TWEEN 20 (Tampão B). Preparou-se um *kit* de complexo de avidina-biotina (ABC) (Vector Labs; Burlingame CA) em 10 ml de PBS contendo 0,1% de

detergente TWEEN 20, que foi pré-incubado durante 30 min à temperatura ambiente durante a incubação. Adicionou-se a solução de ABC (100 µl/poço) e incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente. Lavou-se a placa cinco vezes com Tampão B, depois adicionou-se um substrato de o-fenilenodiamina (OPD) com 100 µl/poço dissolvendo um comprimido de 10 mg de OPD em 10 ml de tampão citrato-PO_4 0,1 M, pH 5,3 e adicionando 7,5 µl de H_2O_2 a 30%. Incubou-se a placa no escuro durante 10-15 min, depois leu-se utilizando um filtro de 492 nm num leitor de placas de ELISA (Titertek Multiskan PLUS; ICN) monitorizado por computador utilizando o *software* de leitor de placas Delta Soft II da Biometallics (Princeton NJ). Foi gerada uma curva de calibração utilizando a hialuronidase testicular de bovino, por um ajuste de curva de quatro parâmetros da preparação de hialuronidase comercial, e as amostras desconhecidas foram interpoladas através da sua absorvância a 492 nm.

Para analisar a dependência do pH das hialuronidases, são utilizadas sHASEGP recombinante purificada e hialuronidase testicular de bovino. A dependência do pH da actividade enzimática é medida diluindo sHASEGP purificada ou hialuronidase testicular de bovino parcialmente purificada até 0,1 rTRU nos tampões seguintes: formato 50 mM, pH 3-4,5; acetato 50 mM, pH 5-6; MES 50 mM, pH 6-7; ou HEPES 50 mM, pH 7-8. As amostras foram ensaiadas durante 30 min a 37°C e a actividade foi expressa como uma percentagem de actividade máxima. Não se utilizou NaCl nos tampões, uma vez que este pode alterar os pH óptimos de preparações de hialuronidase testicular (Gold, Biochem. J. 205:69-74, 1982; Gacesa *et al.* Biochem. Soc. Trans. 7:1287-1289, 1979); concentrações salinas fisiológicas (0,15 M) diminuíram o pH aparente óptimo, um efeito que foi mais pronunciado em preparações purificadas da enzima testicular do que na amostra em bruto original.

b. Resultados

O hialuronano foi biotinilado num passo de reacção utilizando biotina-hidrazida e EDAC. Limitando a EDAC, que acopla os grupos carboxilo livres no HA com biotina-hidrazida, apenas foi marcada uma pequena fracção dos resíduos de ácido glucurónico totais no HA. Esta quantidade de EDAC (3×10^{-5} M) adicionada a HA ($2,8 \times 10^{-3}$ M) resulta num máximo de uma molécula

de biotina-hidrazida acoplada por 93 unidades de dissacárido de HA.

Preparou-se um ajustamento de curva de quatro parâmetros de misturas reaccionais padrão de hialuronidase testicular de bovino medidas a pH 3,7, e diluídas de 1,0 a 1×10^{-6} TRU/poço. Os ajustamentos de curva de quatro parâmetros foram estabelecidos a partir da equação y=((A-D)/(1+(conc/C)^B)) + D) onde $\log_{it}$ y = ln(y'/1-y'), y'= (y-D)/(A-D), B=-b/ln 10 e C=EXP(a/B). Os quatro parâmetros (A, B, C, D) foram calculados com um programa de *software* que utilizou o algoritmo 2+2 com regressão linear (Rodbard *et al.*, Clin. Chem. 22:350, 1976). Este ajustamento de curva incorpora os aspectos sigmoidais da curva de calibração. A exactidão óptima para medição de uma amostra ocorre tipicamente de 0,001 a 0,01 TRU/poço para uma incubação de 30 min. Para uma incubação de 60 min, é detectável 1/1000 de uma TRU. Pode também ser utilizada uma curva logarítmica padrão num intervalo de valores mais curto para estabelecer um ajustamento da curva de calibração. Ainda que o invento tenha sido descrito em relação a concretizações preferidas específicas, será de notar que o invento como reivindicado não deverá estar indevidamente limitado a estas concretizações específicas.

EXEMPLO 2

CLONAGEM DE ADNc DE sHASEGP

Ácido nucleico codificando sHASEGP humana pode ser obtido por um perito na especialidade através de vários procedimentos incluindo, mas não limitados a, síntese de genes artificial, RT-PCR e hibridação de biblioteca de ADNc (por exemplo, ver, Gmachl *et al.* FEBS 336(3) 1993, Kimmel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 1993 10071-10075). Alternativamente, clones codificando sHASEGP humana podem ser obtidos na IMAGE, ou noutros fornecedores de sequências de genes humanos (Invitrogen Clone ID IOH10647).

Calculou-se que o ADNc de PH20 humano a todo o comprimento tinha 2009 nucleótidos de comprimento e continha uma grelha de leitura aberta de 1530 nucleótidos. A UTR 5' é invulgarmente grande, o que pode indicar um intrão retido e pode inibir a tradução impedindo o ribossoma de se ligar ao codão metionina

de iniciação correcto devido a 9 codões de início não codificantes na UTR 5'. É previsto que a proteína (Número de acesso Genbank NP_003108) compreende 509 aminoácidos SEQ ID NO:1 com uma massa molecular calculada de 58 kDa.

Para sequenciação de clones, bandas amplificadas por PCR foram excisadas, e eluídas com o Gel Extraction Kit (Qiagen) e clonadas nos vectores apropriados com extremidades compatíveis após digestão de restrição. Todas as reacções de sequenciação foram realizadas em ADN de cadeia dupla com o *kit* de sequenciação de ciclo terminador *Taq* DyeDeoxy (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante, e operadas num sequenciador automático ABI Prism™ (Applied Biosystems).

A grelha de leitura aberta de PH20 humana foi obtida por amplificação de uma biblioteca de ADNc de testículo de humano (Clontech, Palo Alto CA) por reacção em cadeia da polimerase utilizando os iniciadores SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:47. Os produtos de PCR foram digeridos com *Nhe*I e *Bam*HI e clonados nos locais *Nhe*I e *Bam*HI do vector IRESpuro2 (Clontech).

EXEMPLO 4

ISOLAMENTO DE sHASEGP A PARTIR DE ADNc DE PH20 HUMANO

Um vector de expressão de sHASEGP humana recombinante segregada cataliticamente activa, capaz de glicosilação eficaz em células de mamífero, foi gerado como a seguir descrito. São contempladas outras construções de expressão com promotores e genes de selecção para diferentes espécies, tais como levedura e células de insecto, que são também capazes de gerar sHASEGP. Podem também ser utilizados genes de selecção positiva tais como glutamina-sintase ou di-hidrofolato-redutase (DHFR). Os exemplos a seguir apresentados não pretendem restringir mas em vez disso são proporcionados como exemplo de vários sistemas de expressão de plasmídeo que podem ser utilizados.

De modo a construir formas segregadas de sHASEGP, foram construídos mutantes de truncagem que não possuem a extremidade C-terminal hidrófoba. Utilizando um programa de previsão de clivagem de GPI, o local de clivagem da âncora de GPI foi localizado à volta da posição de aminoácido N 483 na proteína

ancorada a GPI a todo o comprimento. Utilizou-se um conjunto de sete iniciadores 3' *nested* para construir um conjunto de sete mutantes de deleção truncados aos quais falta a âncora de GPI prevista iniciando-se na posição Y 482 e cortados progressivamente por um aminoácido. Estes iniciadores foram desenhados para terem locais NheI (5') e BamHI (3') compatíveis para clonar os mutantes de truncagem no vector Irespuro2, quer não marcados com um codão de paragem no iniciador 3', quer como uma proteína marcada com His no terminal C para facilidade de purificação e detecção. Por exemplo, utilizaram-se iniciadores reversos SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 para gerar mutantes de deleção terminando na posição Y 482, F 481 e I 480 sem um marcador 6 His. Outros iniciadores mutantes foram gerados com o mesmo desenho de base com as modificações apropriadas para incluir e excluir os aminoácidos particulares. Para gerar variantes marcados com His, o mesmo conjunto de iniciadores é utilizado como para as variantes não marcadas excepto que os iniciadores não contêm o codão de paragem nos iniciadores reversos respectivos, o iniciador directo permanecendo o mesmo (para a construção marcada com His refiram-se os iniciadores com as SEQ ID NO:19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25 que são os iniciadores reversos sem codão de paragem correspondendo a iniciadores reversos não marcados para as suas construções respectivas). Utilizaram-se iniciadores sobrepostos para construir um espaçador de seis aminoácidos seguido de hexa-histidina dentro de locais BamHI e NotI no vector Irespuro2 tal que foram gerados mutantes marcados com His por ligação dos produtos amplificados por PCR e digeridos por restrição entre os locais NheI e BamHI no vector IRESpuro2 contendo o marcador de His.

Para identificar se a sHASEGP humana podia ou não ser modificada no seu terminal carboxi para gerar uma enzima segregada e activa em meio neutro, foi efectuada uma série de truncagens desde o local de ligação da âncora de GPI até ao "domínio catalítico" previsto com base na homologia com a enzima de veneno de abelha.

ADN codificando o clone de sHASEGP humana a todo o comprimento ancorada a GPI em IRESPuro2 foi utilizado como molde para gerar os vários mutantes de deleção truncados. Programas de modelação de *software* deram vários locais de clivagem

previstos para o polipéptido a todo o comprimento. Um destes locais previstos era na posição de aminoácido N 483 (SEQ ID NO:1). Foram desenhados iniciadores de PCR para sucessivamente truncar a proteína a partir de N 483 para gerar seis mutantes de deleção iniciando-se no Y 482 (carecendo de N) e terminando no E 477 (carecendo de P).

a. Protocolo

Geração de mutante de truncagem carecendo de N 483:

Como molde, foi utilizado o clone de sHASEGP ancorado a GPI a todo o comprimento entre os locais NheI e BamHI em pIRESPuro2. Este molde foi amplificado com um iniciador 5' contendo um local NheI que se inicia na metionina de partida do péptido de sinal nativo em M 1 (SEQ ID NO:14), e um iniciador 3' contendo um local BamHI que termina em Y 482 (SEQ ID NO:8). O produto de PCR foi ensaiado num gel de agarose a 1% para resolver e confirmar a banda amplificada com o tamanho correcto, purificado em gel, digerido por restrição com NheI e BamHI e clonado no vector pIRESPuro2 (Clontech) entre os locais NheI e BamHI gerando um vector de expressão para expressão deste mutante de truncagem de sHASEGP terminando na posição de aminoácido N 482 e carecendo da âncora de GPI com a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:5 para a sequência do polipéptido de sHASEGP resultante até Y 482) e a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:48 - nucleótidos de codificação para o polipéptido na SEQ ID NO:5) como indicado.

Geração dos outros mutantes de truncagem carecendo de Y 482, F 481, I 480, Q 479 e P 478 respectivamente.

A mesma estratégia foi utilizada com a única diferença sendo a utilização do iniciador apropriado 3' para cada mutante. Os iniciadores 3' respectivos são como se segue:

Iniciador 3' para o mutante sHASEGP que carece do Y 482 - SEQ ID NO:9

Iniciador 3' para o mutante que carece do F 481 - SEQ ID NO:10

Iniciador 3' para o mutante que carece do I 480 - SEQ ID NO:11

Iniciador 3' para o mutante que carece do Q 479 - SEQ ID NO:12

Iniciador 3' para o mutante que carece do P 478 - SEQ ID NO:13

Geração de mutantes de deleção adicionais para determinar o domínio de sHASEGP minimamente activo:

Foram efectuadas deleções adicionais, em blocos de dez a vinte aminoácidos, a partir da extremidade 3' do mutante de truncagem de sHASEGP activa a pH neutro mais interior, que é sHASEGP até ao E 477. O iniciador directo de NheI (SEQ ID NO:14) foi utilizado com um iniciador 3' apropriadamente posicionado para amplificar por PCR um mutante de deleção de sHASEGP do comprimento desejado a partir da extremidade carboxi-terminal. Por exemplo, utilizou-se PCR com os iniciadores descritos em SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:26, como os iniciadores 5' e 3', respectivamente, para gerar o polipéptido na SEQ ID NO:49 quando expressos a partir de uma construção de expressão no vector IRESPuro2. Similarmente, utilizou-se PCR com iniciadores 3' reversos descritos nas SEQ ID NO:27, 28, 29, 30, 31 e 32 para gerar mutantes de deleção terminando nas posições de aminoácido A 447, S 430, G 413, S 394, A 372 e S 347, respectivamente, da sHASEGP madura. Os produtos de PCR em cada caso foram digeridos com enzimas NheI e BamHI e o produto digerido foi clonado no vector pIRESPuro2 entre os sítios NheI e BamHI. Alguns clones independentes na construção de expressão final de cada grupo foram testados quanto à actividade de sHASEGP activa em meio neutro segregada por transfecção transiente em células CHO em meio isento de soro CD-CHO (Invitrogen, CA) e retiraram-se amostras nos instantes indicados para ensaio. ADN Miniprep preparado a partir de culturas de um dia para o outro foi transfectado com reagente de transfecção Genejuice (Novagen, CA) seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante. A actividade de hialuronidase foi medida pelo ensaio de microtitulação como acima descrito.

b. Resultados

A actividade de hialuronidase foi medida em mutantes de truncagem de sHASEGP para identificar o domínio minimamente activo para a actividade de hialuronidase activa em meio neutro segregada.

Aminoácido 1 a :	U/ml/24 h, pH 7,4
347	0,000
372	0,000
394	0,000
413	0,000
430	0,000
447	0,000
467	0,089
477	0,567
478	0,692
479	0,750
480	0,575
481	0,740
482	0,329
483	0,800
509	0,044

Os resultados mostraram que todos os seis mutantes de deleção de um aminoácido terminando nos aminoácidos indicados de Y 482 a E 477 deram actividade segregada mais elevada do que sHASEGP ancorada a GPI.

Os resultados mostraram também que deleções para além de A 467 eliminaram qualquer actividade segregada. A actividade em meio neutro segregada a partir dos clones A 467 diminuiu até aproximadamente 10% da encontrada para os clones P 478 ou N 483. Concluiu-se deste modo que mais do que o domínio carboxi-terminal de sHASEGP humana era requerido para criar o domínio de hialuronidase activa em meio neutro, do que anteriormente assumido a partir da enzima de veneno de abelha. As cisteínas no domínio carboxi-terminal são assim necessárias para actividade em meio neutro. Um intervalo muito estreito abrangendo aproximadamente 10 aminoácidos antes do local de clivagem de GPI no N 483 definiu assim o domínio minimamente activo.

EXEMPLO 5

EFEITOS DA MODIFICAÇÃO DO PÉPTIDO DE SINAL NA ACTIVIDADE SECRETORA DE sHASEGP.

A sHASEGP humana possui um péptido de comando nativo previsto invulgarmente longo. Adicionalmente, a existência de dois resíduos cisteína adjacentes no péptido de comando pode conduzir a agregação de multímeros de polipéptido dentro do retículo endoplasmático durante expressão de nível elevado e por isso impede a expressão de nível elevado de uma sHASEGP. Uma série de péptidos de comando secretores mais eficiente foi assim testada para examinar a sua capacidade para melhorar o direccionamento de sHASEGP para secreção.

a. Protocolo

O péptido de comando capa foi construído por hibridação de iniciador sobreposto e PCR de extensão com iniciadores correspondendo às sequências nas SEQ ID NO:37, 38, 39 e 40. A sequência capa amplificada por PCR resultante foi amplificada com iniciadores de flanqueamento contendo um local NheI na extremidade 5' (como descrito na SEQ ID NO:41) e um local EcoRI na extremidade 3' (como descrito na SEQ ID NO:42). Isto permitiu a clonagem do péptido de comando capa (a sequência de polipéptido é como descrita na SEQ ID NO:43) no vector Litmus 39 (NEB) entre locais NheI e EcoRI. A sHASEGP tem um local EcoRI interno; por conseguinte, esta construção capa entre o local NheI e o local EcoRI foi adicionalmente amplificada com um iniciador SpeI 5' (como descrito na SEQ ID NO:44) e um iniciador MluI 3' (como descrito na SEQ ID NO:45). sHASEGP sem âncora de GPI terminando no P 478 foi cortado do pIRESPuro2 com NheI e BamHI e clonado num vector Litmus 39 (NEB) entre os locais NheI e BamHI do vector Litmus 39. Este vector Litmus contendo sHASEGP resultante foi digerido com enzimas de restrição SpeI e MluI e a construção de comando capa amplificada com SpeI e MluI foi clonada neste. Foi realizada mutagénese dirigida neste vector Litmus 39, contendo ambas as sequências capa e sHASEGP, para gerar a fusão *in frame* da sequência de comando capa com o polipéptido maduro de sHASEGP. Pares de iniciadores correspondendo às SEQ ID NO:34 e 35 foram utilizados para gerar o comando capa com a Asp nativa como o aminoácido terminal fundido com o F 38 de sHASEGP (até ao P 478) (como descrito na

SEQ ID NO:46 para a sequência de polipéptido da proteína da fusão). Outras combinações de pares de iniciadores, tais como as concretizadas por SEQ ID NO:33 com SEQ ID NO:35, foram utilizadas para gerar comando capa terminando na Asp (D) terminal fundido com L 36 de sHASEGP, SEQ ID NO:33 com SEQ ID NO:36 foram utilizados para gerar o comando capa terminando na Gly (G) (antes da Asp (D) terminal) fundido com L 36 de sHASEGP, e SEQ ID NO:34 com SEQ ID NO:36 foram utilizados para gerar capa terminando na Gly (G) (antes da Asp (D) terminal) fundido com F 38 de sHASEGP. As fusões capa - sHASEGP obtidas por mutagénese dirigida foram purificadas em gel, digeridas com enzima DpnI para digerir qualquer ADN parental de passagem, e depois digeridas com NheI e BamHI e clonadas no esqueleto HisIRESPuro2 digerido com NheI/BamHI que possui o marcador His (espaçador de seis aminoácidos seguido de seis histidinas) clonado entre locais BamHI e NotI no vector pIRESPuro2 vector. Por conseguinte, por ligação, obtemos uma construção que é NheI-kappa-sHASEGP-BamHI-His em pIRESPuro2. Foram obtidos quatro conjuntos de cada construção que corresponderão às combinações de G ou D na extremidade do comando capa e L 36 ou F 38 no início da sHASEGP madura. Alguns clones independentes a partir de cada tipo de construção foram transfectados em células CHO em meio CD-CHO (Invitrogen, CA) para testar se a presença de comando de secreção capa promoveria ou não níveis aumentados de proteína segregada em comparação com o comando de secreção nativo. ADN Miniprep preparado a partir de culturas de um dia para o outro foi transfectado com reagente de transfecção Genejuice (Novagen, CA) seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante e retiraram-se amostras para teste no ensaio de microtitulação nos instantes indicados. A actividade de hialuronidase foi medida pelo ensaio de microtitulação como acima descrito.

Foram testadas construções de fusão de péptido de comando de cadeia capa de IgG de ratinho - sHASEGP para testar níveis mais elevados de actividade de sHASEGP activa em meio neutro segregada.

b. Resultados

Construção génica de sHASEGP humana	**U/ml/24 h pH 7,4**
Comando capa de IgG - sHASEGP AA 38-478 HIS6	3,0257
Comando nativo - sHASEGP AA 1-478 HIS6	0,4857

Os resultados do ensaio enzimático indicaram que o comando capa de IgG era capaz de melhorar a secreção de sHASEGP aproximadamente 7 a 8 vezes mais elevada do que o comando de secreção nativo em comparação com os clones P478, Y 482 ou N 483 que careciam de um tal comando. Outras construções de comando capa com variações do local de fusão de comando desde a Asp ou a Gly do comando capa até L 36 ou F 38 de sHASEGP produziram também níveis aumentados de actividade de hialuronidase activa em meio neutro segregada. Estes exemplos pretendem alargar em vez de limitar o âmbito do invento, uma vez que outras sequências de comando secretoras eficientes podem ser utilizadas com a mesma tecnologia.

EXEMPLO 6

GERAÇÃO DE UM VECTOR DE EXPRESSÃO DE sHASEGP

Uma sHASEGP sem um epítopo marcador foi gerada por clonagem numa cassete bicistrónica, HZ24 (SEQ ID NO:47). O vector plasmídeo HZ24 para expressão de sHASEGP compreende um esqueleto de vector pCI (Promega), uma sequência de ADN codificando aminoácidos 1-482 de hialuronidase PH20 humana, um local de entrada ribossómico interno (IRES, *internal ribosomal entry site*) do vírus ECMV (Clontech) e o gene de di-hidrofolato-redutase (DHFR) de ratinho. O esqueleto de vector pCI inclui também ADN codificando o gene de resistência de beta-lactamase (AmpR), uma origem de replicação f1, uma região de intensificador/promotor imediato-precoce de citomegalovírus (CMV), um intrão quimérico e um sinal de poliadenilação tardio de SV40 (SV40). O ADN codificando a construção de sHASEGP continha uma sequência de consenso Kozak na metionina do comando de sinal nativo e um codão de paragem na tirosina 482. A construção resultante pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ-24) resulta numa espécie de ARNm simples conduzida pelo promotor de CMV que codifica os aminoácidos 1-482 de PH20 e os aminoácidos 1-187 da

di-hidrofolato-redutase separados pelo local de entrada ribossómico interno.

A grelha de leitura aberta de PH20 humana foi amplificada a partir de um clone ORF Invitrogen (IOH10647, Invitrogen, Carlsbad CA) com um iniciador 5' que introduziu um local NheI e uma sequência de consenso Kozak antes da metionina de PH20 e um iniciador reverso que introduziu um codão de paragem após a tirosina 482 e introduziu um local de restrição BamHI. O produto de PCR resultante foi ligado no plasmídeo pIRESpuro2 (Clontech, Palo Alto, CA) após digestão do fragmento de PCR de PH20 com NheI e BamHI.

EXEMPLO 7

GERAÇÃO DE UMA LINHA DE CÉLULAS EXPRESSANDO sHASEGP

Células CHO DG44 não transfectadas crescendo em meio modificado CD-CHO GIBCO para células DHFR(-), suplementado com glutamina 4 mM e 18 ml de Plurionic F68/L (Gibco), foram semeadas a 0,5 × 10^6 células/ml num frasco misturador em preparação para transfecção. As células foram cultivadas a 37°C numa incubadora humidificada com 5% de CO_2 com 120 rpm para mistura. As células CHO DG44 não transfectadas crescendo exponencialmente foram testadas quanto à viabilidade antes da transfecção.

60 000 000 de células viáveis da cultura de células CHO DG44 não transfectadas foram sedimentadas e ressuspensas até uma densidade de 20 000 000 células em 0,7 mL de tampão de transfecção 2x (HeBS 2X = Hepes 40 mM, pH 7,0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na_2HPO_4 1,4 mM, dextrose 12 mM). A cada alíquota de células ressuspensas, adicionaram-se 0,09 mL do plasmídeo HZ24 linear (250 µg), e as células/soluções de ADN foram transferidas para cuvetes de electroporação de fenda 0,4 cm BTX (Gentronics) à temperatura ambiente. Uma electroporação de controlo negativo foi realizada sem qualquer ADN de plasmídeo misturado com as células. As misturas de célula/plasmídeo foram electroporadas com uma descarga de condensador de 330 V e 960 µF ou 350 V e 960 µF.

As células foram removidas das cuvetes após electroporação e transferidas para 5 mL de meio modificado CD-CHO para células

DHFR(-), suplementado com glutamina 4 mM e 18 ml de Plurionic F68/L (Gibco), e deixaram-se crescer num poço de uma placa de cultura de tecidos de 6 poços sem selecção durante 2 dias a 37°C numa incubadora humidificada com 5% de CO_2.

Dois dias pós electroporação, removeram-se 0,5 mL de meio de cultura de tecidos de cada poço e testou-se quanto à presença de actividade de hialuronidase.

Actividade de hialuronidase inicial de células CHO DG44 transfectadas com HZ24 às 40 horas pós-transfecção

	Diluição	Actividade Unidades/ml
Transfecção 1 330V	1 para 10	0,25
Transfecção 2 350V	1 para 10	0,52
Controlo Negativo	1 para 10	0,015

Células da transfecção 2 (350 V) foram recolhidas a partir do poço de cultura de tecidos, contadas e diluídas até 10 000 a 20 000 células viáveis por mL. Uma alíquota de 0,1 mL da suspensão de células foi transferida para cada poço de cinco placas de cultura de tecidos de fundo redondo de 96 poços. Adicionou-se 0,1 mL de meio CD-CHO (GIBCO) contendo Glutamax-1 4 mM, e sem suplementos de hipoxantina e timidina, aos poços contendo células (volume final 0,2 mL).

Foram identificados dez clones a partir das 5 placas cultivadas sem metotrexato.

ID placa/poço	Actividade de hialuronidase relativa
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304
2D9	273

ID placa/poço	Actividade de hialuronidase relativa
4D10	302
1E11	242
A1 (+) controlo	333
H12 (-) controlo	0

Seis clones de HZ24 foram expandidos em cultura e transferidos para balões misturadores como suspensões de células individuais. Os clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 e 4D10 foram plaqueados em placas de cultura de tecidos de fundo redondo de 96 poços utilizando uma estratégia de diluição infinita bidimensional. Os clones diluídos foram cultivados num fundo de 500 células CHO DG44 não transfectadas por poço, para proporcionar os factores de crescimento necessários para os dias iniciais em cultura. Foram preparadas dez placas por subclone.

O clone 3D3 produziu 24 subclones visuais. Foi medida actividade de hialuronidase significativa nos sobrenadantes de 8 dos 24 subclones (> 50 Unidades/mL), e estes 8 subclones foram expandidos em balões de cultura de tecidos T-25 na presença de metotrexato 50 nM. O clone 3D3 50 nM foi adicionalmente expandido em metotrexato 500 nM dando origem a clones produzindo mais de 1000 Unidades/ml em balões misturadores (clone 3D3 5M).

EXEMPLO 8

PRODUÇÃO DE sHASEGP

Um frasco de 3D3 5M foi descongelado e expandido a partir dos balões T até balões giratórios de 1 L em CDM-CHO (Invitrogen, Carslbad CA) suplementado com metotrexato 100 nM e Glutamax (Invitrogen). As células foram transferidas dos balões giratórios para um biorreactor de 5 L (Braun) com uma densidade de inoculação de $4,0 \times 10^5$ células viáveis por ml. Os parâmetros foram uma regulação de temperatura, 37ºC, pH 7,2 (regulação inicial), com uma regulação de oxigénio dissolvido de 25% e um recobrimento de ar de 0-100 cm^3/min. Às 168 h, adicionaram-se 250 ml de meio Feed #1 (CD-CHO + 50 g/L de glucose). Às 216 horas, adicionaram-se 250 ml de Meio Feed #2

(CD-CHO + 50 g/L de glucose + butirato de sódio 10 mM), e às 264 horas adicionaram-se 250 ml de meio Feed #2. Este processo resultou numa produtividade final de 1600 Unidades por ml com uma densidade celular máxima de 6 milhões de células/ml. Constatou-se que a adição de butirato de sódio melhora dramaticamente a produção de sHASEGP nas etapas finais de produção.

Crescimento de 3D3-5M & produção de sHASEGP, biorreactor de 5 L

Horas de ensaio	Células viáveis $\times 10^5$	% de Viáveis	Unidades/ml	Vol (mL)	[Glucose]	Feed
0	4,4	100	0	4500	547	
24	5,7	100	0	4500	536	
48	10,1	100	37	4500	501	
72	17,1	99	62	4500	421	
96	28,6	99	118	4500	325	
120	28,8	99	240	4500	274	
144	60,2	100	423	4500	161	
168	55	100	478	4500	92	250ml Feed #1
192	66,6	98	512	4750	370	
216	55,2	92	610	4750	573	250ml Feed#2
240	53	88	710	5000	573	
264	49,8	84	852	5000	474	250ml Feed #2
288	40	70	985	5250	770	
312	31	61	1467	5250	773	
336	25,4	52	1676	5250	690	

EXEMPLO 9

PURIFICAÇÃO DE sHASEGP

Meio condicionado a partir do clone 3D3 foi clarificado por filtração profunda e diafiltração de fluxo tangencial em Hepes 10 mM pH 7,0. A HASEGP solúvel foi depois purificada por cromatografia sequencial em permuta iónica de Q-Sepharose (Pharmacia), cromatografia de interacção hidrófoba em Phenyl Sepharose (Pharmacia), cromatografia em fenilboronato (Prometics) e hidroxiapatite (Biorad, Richmond, CA).

Ligou-se a sHASEGP a Q-Sepharose e eluiu-se com NaCl 400 mM no mesmo tampão. Diluiu-se o eluído com sulfato de amónio 2 M até uma concentração final de $(NH_4)_2SO_4$ 500 mM e fez-se passar através de uma coluna de Phenyl Sepharose (baixa sub), seguindo-se ligação sob as mesmas condições a uma resina de fenilboronato. Eluiu-se sHASEGP a partir da coluna de Phenyl Sepharose em Hepes pH 6,9 após lavagem a pH 9,0 em bicina 50 mM sem $(NH_4)_2SO_4$. Carregou-se o eluído numa resina de hidroxiapatite cerâmica a pH 6,9 em PO_4 5 mM, $CaCl_2$ 1 mM e eluiu-se com PO_4 80 mM pH 7,4 com $CaCl_2$ 0,1 mM.

A sHASEGP purificada resultante possuía uma actividade específica superior a 65 000 Unidades USP/mg de proteína através do ensaio de microturvação utilizando o padrão de referência USP. A sHASEGP foi eluída como um único pico de 24 a 26 minutos a partir de uma coluna de estireno-divinilbenzeno Pharmacia 5RPC com um gradiente entre 0,1% de TFA/H_2O e 0,1% de TFA/90% de acetonitrilo/10% de H_2O e resolvida como uma banda larga individual de 61 kDa por electroforese SDS que foi reduzida para uma banda estreita de 51 kDa após tratamento com PNGase F. A sequenciação de aminoácidos N-terminais revelou que o péptido de comando tinha sido eficientemente removido.

Sequência de aminoácidos N-terminal de sHASEGP purificada bioquimicamente.

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Teórico	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn
Observado	-	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn

EXEMPLO 10

ANÁLISE DE GLICOSILAÇÃO DE sHASEGP DERIVADA DE CHO DG44

Existem dados contraditórios sobre se sHASEGP de diferentes espécies requerem ou não glicosilação para a sua actividade catalítica. Por exemplo, é noticiado que hialuronidase de veneno de abelha enzimaticamente activa pode ser sintetizada em células que não possuem a maquinaria de glicosilação, *i.e.* tal como *E. coli*. Além disso, o tratamento com PNGase de hialuronidase de testículo de bovino purificada não inactivou a actividade enzimática (Yamagata *et al.* 1997). Outros estudos relatam perda de actividade após desglicosilação e que são adicionalmente requeridas ligações dissulfureto.

Como todos estes testes anteriores foram realizados utilizando preparações quer em bruto quer parcialmente purificadas, não era evidente se a perda de actividade era ou não resultado de exposição de enzima desglicosilada a proteases contaminantes nas preparações em bruto ou de uma relação funcional directa entre glicosilação e actividade catalítica.

a. Protocolo

Para determinar se glicosilação ligada a N funcional podia ser introduzida em sHASEGP humana utilizando um sistema de expressão baseado em CHO sob condições isentas de proteína, um ADNc codificando sHASEGP humana-HIS6 foi expresso em células CHO utilizando uma cassete bicistrónica IRESpuro em meio definido quimicamente. Cultivaram-se as células durante 72 horas em CDM-CHO (Invitrogen/Gibco) seguindo-se concentração e diafiltração de fluxo tangencial numa unidade Pellicon TFF (Millipore) com membranas de corte de 30 kDa. O concentrado foi permutado com Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM. O diafiltrado foi depois carregado numa resina DEAE Streamline Sepharose e eluído com um gradiente de NaCl de 0-1 M numa resina Pharmacia FPLC. A sHASEGP humana foi eluída entre 10-30% de NaCl. Os níveis de sHASEGP em fracções da coluna determinaram que a maior parte da enzima foi recuperada no gradiente de 10-30% de NaCl. A enzima a partir do gradiente de 10-30% de NaCl foi adicionalmente purificada através de cromatografia de afinidade numa resina IMAC carregada com Ni. A sHASEGP humana foi eluída a partir da resina IMAC após lavagem com imidizole 10 mM com

acetato 50 mM pH 5,0. A proteína foi concentrada e dialisada contra Hepes 10 mM pH 7,4. Determinou-se que a enzima altamente purificada possuía uma actividade específica de 97000 Unidades/mg proteína na presença de cálcio 1 mM e 1 mg/ml de HSA no ensaio de microtitulação de substrato biotinilado baseado em ELISA.

Para detectar alterações em massa molecular relativa de proteína, sHASEGP humana purificada foi tratada com PNGase ou neuraminidase de um dia para o outro seguindo-se electroforese em gel, electotransferência e análise *western blot* com um anticorpo monoclonal anti-His6 ligado a HRP (Qiagen) e detecção ECL.

b. Resultados

A análise *western blot* determinou que a sHASEGP humana produzida em células CHO era sensível ao tratamento com PNGase. A massa molecular relativa de sHASEGP humana revelou que a proteína estava altamente glicosilada. Após digestão completa de um dia para o outro com PNGase, a sHASEGP humana foi reduzida numa única espécie confirmando que a ligeira heterogeneidade da banda não digerida podia ser atribuída a resíduos açúcar ligados a N. A digestão parcial com PNGase F mostrou uma série de intermediários desviando-se da sHASEGP não tratada e com um desvio progressivo com tratamento mais longo. Ainda que as bandas fossem algo difusas num gel a 7%, podiam ser visualizadas pelo menos 6 isoformas intermediárias diferentes.

O tratamento de sHASEGP com neuraminidase revelou que as células CHO eram de facto capazes de sintetizar sHASEGP humana sialada. Após tratamento com neuraminidase e análise *Western Blot* de sHASEGP em géis a 7%, a sHASEGP recombinante humana derivada de CHO revelou um desvio em mobilidade de aproximadamente 1-3 kDa em comparação com sHASEGP não tratada. Este é assim o primeiro relato da geração de uma sHASEGP humana substancialmente sialada. Isto é muito valioso tanto para a estabilidade como para melhorar a meia-vida no soro de uma sHASEGP humana uma vez que sHASEGP de esperma nativa a partir de muitas espécies não possui sialação e não reage com lectinas específicas de ácido siálico.

Análise FACE de sHASEGP

A análise de oligossacáridos de sHASEGP activa por análise FACE permite a rápida determinação de perfis de sHASEGP cataliticamente activas.

Protocolo

Hialuronidase purificada a partir do clone 3D3 5M foi avaliada utilizando FACE® N-Linked Oligosacchride Profiling (Prozyme). Oligossacáridos foram clivados a partir de 128,7 µg de glicoproteínas por digestão enzimática com N-glicanase (também conhecida como PNGase), marcados utilizando o fluoróforo ANTS, e separados por electroforese. As posições relativas das bandas de oligossacárido foram determinadas por ensaio da amostra e de diluições da amostra ao lado de uma escala padrão de oligossacárido que indica a distância de migração em unidades de Grau de Polimerização (DP).

Resultados

O perfil N para a amostra de hialuronidase consiste de dez bandas das quais seis (ensaiadas concomitantemente com as bandas padrão de oligossacárido G5 - G12) tinham intensidades superiores a 9%. Adicionalmente, a banda ensaiada ao lado do padrão G9 era a mais intensa com intensidades de 35% - 46%.

sHAS

Análise de oligossacárido EGP

Oligossacárido de sHASEGP	Grau de polimerização	Percentagem do total
1	15,64	1,2
2	13,68	3,4
3	11,61	10,0
4	10,04	10,4
5	8,37	35,4
6	7,32	9,7
7	6,14	9,0
8	5,57	12,4

Oligossacárido de sHASEGP	Grau de polimerização	Percentagem do total
9	3,84	2,3
10	3,26	0,5

EXEMPLO 11

DEPENDÊNCIA DA ACTIVIDADE DA ENZIMA DA GLICOSILAÇÃO DE sHASEGP LIGADA A N

a. Protocolo

Amostras de sHASEGP-HIS6 purificada foram misturadas com tampão contendo neuraminidase e PNGase com e sem octilglucósido 50 mM de um dia para o outro a 37ºC. Por desvio em gel a partir da análise *Western Blot* verificou-se que os oligossacáridos tinham sido removidos.

b. Resultados

Amostra	U/ml
No Rx	22,01
Neuraminidase O/N OG 50 mM	23,57
PNGase F com OG 50 mM	0,0
PNGase F sem OG 50 mM o/n	10,74

EXEMPLO 12

ACTIVIDADE DE sHASEGP EM RELAÇÃO A GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS E NÃO SULFATADOS

Para além do ensaio baseado em microtitulação utilizando HA, a especificidade de substrato de sHASEGP em relação a outros glicosaminoglicanos ou proteoglicanos pode ser testada, utilizando um ensaio de desvio em gel com substratos purificados para determinar a actividade de sHASEGP em relação a outros glicosaminoglicanos. Muitos ensaios de hialuronidase têm sido baseados na medição da geração de novos grupos N-acetilamino redutores (Bonner e Cantey, Clin. Chim. Acta 13:746-752, 1966), ou da perda de viscosidade (De Salegui *et al.*, Arch. Biochem.

Biophys. 121:548-554, 1967) ou turvação (Dorfman e Ott, J. Biol. Chem. 172:367, 1948). Com substratos purificados todos estes métodos são suficientes para determinação da presença ou ausência de actividade endoglucosamídica.

a. Protocolo

ENSAIO DE DESVIO EM GEL - Substratos purificados são misturados com sHASEGP recombinante para testar a actividade de endoglucosidase que origina uma mobilidade aumentada de substrato no seio do gel. Sulfato de condroitina A, agrecano e D foram da Calbiochem. Hialuronano (cordão umbilical humano), sulfato de condroitina C, sulfato de dermatano e sulfato de heparano são obtidos na Calbiochem. Hialuronano de cordão umbilical humano foi obtido na ICN. Cada substrato de teste é diluído até 0,1 mg/ml. Amostras de 10 µl de sHASEGP purificada ou também de meios condicionados a partir de células expressando sHASEGP são misturadas com 90 µl de substrato de teste em tampão desejado e incubadas durante 3 horas a 37ºC. Após incubação, as amostras são neutralizadas com tampão de amostra (Tris EDTA pH 8,0, azul de bromofenol e glicerol) seguindo-se electroforese em géis de poliacrilamida a 15%. Os glicosaminoglicanos são detectados por coloração dos géis em Azul de Alciano a 0,5% em ácido acético glacial a 3% de um dia para o outro seguindo-se descoloração em ácido acético glacial a 7%. A degradação é determinada por comparação da mobilidade do substrato na presença e na ausência de enzima.

b. Resultados

Incubaram-se 100 Unidades de $sHASEGP_{HIS6}$ em 10 µl com 90 µl de tampão Hepes 10 mM com 50 µg/ml de albumina de soro humano, durante 2 horas a 37ºC, contendo 10 µg de vários glicosaminoglicanos e proteoglicanos. A análise electroforética seguida de coloração com Azul de Alciano revelou desvios de mobilidade aumentada para uma única espécie em sulfato de condroitina A, C e D, agrecano e hialuronano mas não sulfato de heparano nem sulfato de condroitina B. Enquanto os glicosaminoglicanos não digeridos correram como uma mancha no meio do gel, os produtos digeridos mostraram a maioria da mancha de Azul de Alciano correndo na frente de pigmento com uma pequena quantidade de material correndo como uma escala incremental.

EXEMPLO 13

EFEITOS DE IÕES METÁLICOS NA ACTIVAÇÃO DE sHASEGP

Para além do requisito de glicosilação para actividade enzimática óptima, verificou-se que a sHASEGP humana era activada com catiões para uma actividade enzimática óptima. No processo de purificação, verificou-se que a sHASEGP tinha uma actividade específica baixa após passos de cromatografia sucessivos. Verificou-se que a sHASEGP marcada com HIS6 tinha uma actividade específica muito baixa quando purificada até à homogeneidade a partir de DEAE seguida de purificações em Ni-IMAC sucessivas. Como as resinas IMAC podem quelar iões metálicos, vários metais foram adicionados de novo a sHASEGP para determinar a actividade enzimática relativa.

a. Protocolo

A sHASEGP purificada foi testada após incubação com níquel (Ni), cobalto (Co), zinco (Zn), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) 0,1 mM, durante 2 horas à temperatura ambiente, seguindo-se determinação da actividade de hialuronidase no ensaio baseado em microtitulação.

b. Resultados

Aditivo de sal de metal	Actividade em meio neutro U/ml
SEM ADITIVOS	11,909
Ni 100 uM	6,0306
Co 100 uM	8,972
Zn 100 uM	3,7476
Ca 100 uM	101,9892

Verificou-se um aumento significativo na actividade de hialuronidase após incubação de sHASEGP com cálcio 0,1 mM ou magnésio 0,1 mM. Não se verificou uma tal activação após incubação com outros metais. A adição de cálcio a sHASEGP aumentou a actividade específica da enzima até aproximadamente 97 000 Unidades por mg de proteína com base na medição de A_{280}. A curva dose-resposta dos metais cálcio e magnésio foi depois

testada para determinar a concentração óptima de iões metálicos para enzima.

Metal bivalente mM	[Ca++]	[Mg++]
100	1	1.3
10	108	104
1	169	164
0,1	123	78
0,01	59	18
0,001	47	13
0,0001	39	13
0,00001	55	15

Verificou-se que a activação de sHASEGP ocorria na gama micromolar. Concentrações acima de 10 mM foram inibidoras para cálcio e magnésio. Para excluir a activação não específica de substrato em vez da activação pela enzima, incubou-se cloreto de cálcio em tampão Hepes 10 mM com o substrato biotinilado imobilizado sobre a placa de microtitulação seguida de lavagem. Não se verificou qualquer activação quando a enzima foi adicionada à placa pré-incubada com cálcio que tinha sido lavada. A activação foi também testada em sHASEGP nativa libertada com fosfolipase C o que revelou uma activação similar com cálcio excluindo um artefacto do epítopo marcador HIS6 no terminal carboxi.

EXEMPLO 14

EFEITOS DE ALBUMINA NA ACTIVIDADE DE sHASEGP

Constatou-se que a diluição de rHUPH20 recombinante e doutras preparações de hialuronidases derivadas de testículo de matadouro requereram albumina para além de cálcio para actividade óptima.

a. Protocolo

Diluiu-se albumina de soro de bovino (ICN) em tampão Hepes 10 mM com cálcio para determinar os efeitos da proteína albumina na actividade enzimática. Foram examinados ensaios enzimáticos

com sHASEGP e preparações comerciais utilizando não só $CaCl_2$ 1 mM mas também albumina de soro humano 1 mg/ml.

b. Resultados

Foi encontrada activação da actividade de hialuronidase para diluições elevadas na presença de albumina. Não foi claro se esta activação era ou não um resultado de impedimento da desnaturação ou se a albumina afectava a disponibilidade do substrato. Uma formulação preferível de sHASEGP humana podia deste modo incluir albumina e um sal de metal consistindo quer de cálcio quer de magnésio.

EXEMPLO 15

DISSEMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DE sHASEGP PURIFICADA *IN VIVO*

a. Protocolo

sHASEGP purificada em Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM em Pluronic a 0,1% foi diluída até 0,5 U/µl em água isenta de pirogénio com NaCl 0,15 M. Foi preparada uma série de diluições em 20 µl finais de solução salina para dar um total de 0,01, 0,05, 0,1 Unidades por injecção. Adicionaram-se 20 µl de solução de Azul de Tripano até um volume final de 40 µl e injectou-se subcutaneamente na pele lateral de cada lado de ratinhos balb $^{Nu/Nu}$ que tinham sido anteriormente anestesiados i.p. por administração de cetamina/xilazina. As áreas coradas foram medidas em 2 dimensões com um microcalibrador de t=0 até t=45 min. A área foi representada em mm^2. Como controlo foi incluída HYAL1 humana recombinante que carece de actividade em meio neutro mas é segregada.

b. Resultados

ARTIGO DE TESTE	ÁREA CORADA AOS @ 45 MIN
A. Controlo de sol. salina	51,5mm^2
B. sHASEGP 0,01U	76,8 mm^2
C. sHASEGP 0,05U	98,22mm^2
D. sHASEGP 0,10U	180,4mm^2
E. HYAL1 100U	67,48 mm^2

EXEMPLO 16

CINÉTICA DA ACTIVIDADE DE DIFUSÃO DE sHASEGP

a. Protocolo

sHASEGP$_{His6}$ purificada recombinante foi separada em 2 alíquotas. Uma foi aquecida a 95ºC durante 15 minutos num termociclador com uma tampa aquecida. A outra permaneceu à temperatura ambiente. A inactivação térmica da actividade da enzima foi verificada no ensaio enzimático baseado em microtitulação. Para análise cinética testou-se material inactivado por calor *versus* material nativo. Injectaram-se subcutaneamente 4 Unidades de sHASEGP purificada ou material inactivado por calor equivalente com corante Azul de Tripano. As áreas foram testadas em vários momentos até 15 minutos.

b. Resultados

4 UNIDADES	4 UNIDADES INACTIVADAS POR CALOR
$t_{minuto\ pós\text{-}injecção}$	$t_{minuto\ pós\text{-}injecção}$
t_0 = 52,38	t_0 = 50,58
t_3 = 116,51	t_3 =65,48
$t_{6,5}$= 181,93	$T_{6,5}$ =63,87
t_{10}= 216,96	T_{10} =65,80
t_{16}= 279,99	T_{16} =74,3

EXEMPLO 17

RESTAURAÇÃO DA BARREIRA DÉRMICA QUEBRADA POR sHASEGP

a. Protocolo

Para estabelecer o tempo de regeneração dos poros abertos com sHASEGP após administração subcutânea, injectaram-se subcutaneamente 2 Unidades de sHASEGP purificada ou controlo de solução salina em dois flancos laterais opostos em animais a t=0 seguindo-se injecção com Azul de Tripano no mesmo local aos 30 min, 60 min e 24 horas. A área da difusão de corante aos

t=15 minutos pós-injecção foi registada para cada instante em comparação com o controlo.

b. Resultados

2 UNIDADES	CONTROLO DE SOLUÇÃO SALINA
$t_{horas\ pós\text{-}injecção\ de\ sHASEGP}$	$t_{horas\ pós\text{-}injecção\ de\ sHASEGP}$
$t_{0,5h}$= 183	$t_{0,5h}$= 54
t_{1h}= 167	t_{1h} = 50
t_{22h} = 61	t_{22h}= 48

Os resultados demonstram que a barreira dérmica se reconstitui nas 24 horas após administração de 2 Unidades de enzima.

EXEMPLO 18

DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE CANAIS ABERTOS POR sHASEGP

Constatou-se que a sHASEGP humana abriu canais no espaço intersticial suficientes para permitir a difusão de uma molécula pequena, *i.e.* corante Azul de Tripano. Contudo, era desconhecido quais eram os limites superiores do tamanho de partículas que se podiam difundir na presença de sHASEGP.

a. Protocolo

Moléculas fluorescentes de tamanhos variáveis foram utilizadas para determinar o tamanho dos canais abertos por sHASEGP humana. Dextranos fluoresceínados de 4400 e 2 milhões de peso molecular médio (Sigma), bem como pérolas marcadas com fluoresceína de diâmetros definidos, desde 20 nanómetros a 500 nanómetros (Molecular Probes), foram administrados subcutaneamente num volume de 40 µl com a injecção seguinte de sHASEGP ou controlo de solução salina nos mesmos locais. A área da frente de corante foi depois medida em duas dimensões após 15 minutos pós-injecção.

b. Resultados

Agente de difusão	Tamanho de partícula do teste de difusão	Área aos 15 min	Desvio padrão
sHASEGP	4400 Da	**84,2**	25,7
Controlo	4400 Da	**38,0**	5,8
sHASEGP	2x10E6 Da	**141,2**	4,5
Controlo	2x10E6 Da	**51,7**	8,1
sHASEGP	Diâmetro de 20nm	**92,3**	20,6
Controlo	Diâmetro de 20nm	**51,6**	3,0
sHASEGP	Diâmetro de 100nm	**61,0**	5,7
Controlo	Diâmetro de 100nm	**40,0**	7,0
sHASEGP	Diâmetro de 200nm	**35,5**	1,6
Controlo	Diâmetro de 200nm	**27,9**	8,2
sHASEGP	Diâmetro de 500nm	**44,8**	13,6
Controlo	Diâmetro de 500nm	**41,2**	9,8

Os resultados demonstraram que moléculas de aproximadamente 1 kDa (Azul de Tripano) até 50 nm de diâmetro (pérolas de látex) mostraram difusão melhorada após administração de sHASEGP. Enquanto a albumina de soro bovino (66 kDa) mostrou uma cinética de difusão similar ao Azul de Tripano, as pérolas de látex de 50 nm requereram significativamente mais tempo para se difundirem. As pérolas de 500 nm não mostraram qualquer difusão até aos 480 minutos.

EXEMPLO 19

PERFIS FARMACOCINÉTICOS NO SORO DE ANTICORPOS BIOTINILADOS APÓS CO-INJECÇÃO SUBCUTÂNEA DE sHASEGP HUMANA.

a. Protocolo

Ratinhos balb/c fêmeas foram anestesiadas com uma mistura de cetamina/xilazina. Os ratinhos foram depois injectados subcutaneamente com 20 µl de solução 0,5 mg/ml de IgG de ratinho biotinilada misturados quer com 20 µl de solução salina quer com 20 µl de sHASEGP contendo 4 Unidades de actividade.

b. Resultados

TEMPO PÓS-INJECÇÃO	CONTROLO	sHASEGP (4U)
IgG Sérica t=0 h	0 ng/ml	0 ng/ml
IgG Sérica t=2h	0 ng/ml	360 ng/ml
IgG Sérica t=51h	4152 ng/ml	4176 ng/ml

Os resultados demonstram que a sHASEGP aumenta a cinética de distribuição no soro de moléculas grandes em circulação. Onde não podia ser detectada qualquer IgG biotinilada no grupo de controlo às 2 horas, 360 ng/ml eram evidentes às 2 horas num grupo de sHASEGP.

EXEMPLO 20

ACTIVIDADE DE DISSEMINAÇÃO DE MOLÉCULAS INJECTADAS SUBCUTANEAMENTE APÓS INJECÇÃO INTRAVENOSA DE sHASEGP HUMANA

a. Protocolo

Foram utilizados quatro locais para injecção de corante por dose de cada artigo de teste e controlo de transportador. A injecção de corante foi 45 minutos após injecção i.v.. Cada dose de teste ou artigo de controlo foi injectado i.v. em 2 animais. A medição da área da frente de corante 45 minutos depois da administração de enzima foi calculada aos 2,5, 5, 10 e 15 minutos para cada dose ou controlo de transportador.

b. Resultados

Os resultados demonstraram que sHASEGP altamente purificada estava disponível sistemicamente para tecidos distais após administração intravenosa. A actividade de disseminação de sHASEGP administrada sistemicamente era dependente da dose, com uma injecção de 10 unidades sendo indistinguível do controlo de transportador.

Tipo	**Dose IV**	**Tempo, minutos**	**Área média (mm^2)**	**D.P.**
PH20	1000	2,5	86,417	2,834193
PH20	1000	5	102,17	2,221146
PH20	1000	10	124,53	6,304944
PH20	1000	15	129,81	1,434319

Tipo	Dose IV	Tempo, minutos	Área média (mm^2)	D.P.
PH20	300	2,5	59,137	7,218615
PH20	300	5	73,638	7,51197
PH20	300	10	87,092	8,686008
PH20	300	15	92,337	10,66466
PH20	100	2,5	56,308	7,741934
PH20	100	5	63,156	11,42052
PH20	100	10	76,519	16,18449
PH20	100	15	77,432	17,32264
PH20	30	2,5	50,534	10,64287
PH20	30	5	59,493	5,163971
PH20	30	10	68,102	11,00071
PH20	30	15	71,118	9,934212
PH20	10	2,5	36,4	3,807072
PH20	10	5	39,859	6,680932
PH20	10	10	45,649	4,44936
PH20	10	15	48,41	6,546835
Controlo	0	2,5	34,652	5,935037
Controlo	0	5	36,279	3,614544
Controlo	0	10	44,687	5,821216
Controlo	0	15	53,002	2,812439

A descrição inclui as seguintes cláusulas:

Cláusulas

1. Uma glicoproteína substancialmente purificada, compreendendo um polipéptido de hialuronidase solúvel activa em meio neutro e pelo menos uma porção açúcar ligada a N, em que a porção açúcar ligada a N está ligada covalentemente a um resíduo de asparagina do polipéptido.

2. O polipéptido da cláusula 1, em que o polipéptido é seleccionado entre: (a) um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos codificada pela sequência que inclui pelo menos cerca de 74% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO:1; (b) um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos codificada pela sequência de nucleótidos apresentada em SEQ ID NO:6; (c) um polipéptido que compreende

uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de nucleótidos que hibrida ao longo de pelo menos 85% de todo o seu comprimento sob condições de rigor elevado com a sequência de nucleótidos apresentada em SEQ ID NO:6; ou (d) um polipéptido que é codificado por uma sequência de nucleótidos que é uma variante de *splicing* da sequência de nucleótidos que compreende a sequência apresentada em SEQ ID NO:50.

3. O polipéptido da cláusula 1, em que a referida porção açúcar está ligada covalentemente a um resíduo de asparagina seleccionado entre os aminoácidos 82, 166, 235, 254, 368, 393 ou 490 como apresentado em SEQ ID NO:1.

4. O polipéptido da cláusula 1, em que a referida porção açúcar está ligada covalentemente ao referido polipéptido através de uma ligação sensível a PNGase.

5. O polipéptido da cláusula 1, em que a referida porção açúcar é um do tipo de elevado teor em manose.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> DeliaTroph Pharmaceuticals, Inc.
Gregory Frost,
Anirban Kundu,
Louis Bookbinder,

<120> GLICOPROTEÍNA HIALURONIDASE SOLÚVEL (SHASEGP), PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DA MESMA, SUAS UTILIZAÇÕES E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE A COMPREENDEM

<130> DELIA1340WO

<150> US 60/452,360
<151> 2003-03-05

<160> 53

<170> FastSEQ for Windows version 4.0

<210> 1
<211> 509
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CARBOHYD
<222> 82, 166, 235, 254, 368, 393, 490

<400> 1

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

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

<210> 2
<211> 35
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
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
        35
```

<210> 3
<211> 474
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

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

<210> 4
<211> 448
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```
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> 5
<211> 482
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

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

<210> 6
<211> 1530
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1530)
<223> Glicoproteína Hialuronidase Ancorada em GPI PH-20

<400> 6

```
atg gga gtg cta aaa ttc aag cac atc ttt ttc aga agc ttt gtt aaa   48
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15

tca agt gga gta tcc cag ata gtt ttc acc ttc ctt ctg att cca tgt   96
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30

tgc ttg act ctg aat ttc aga gca cct cct gtt att cca aat gtg cct   144
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45

ttc ctc tgg gcc tgg aat gcc cca agt gaa ttt tgt ctt gga aaa ttt   192
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60

gat gag cca cta gat atg agc ctc ttc tct ttc ata gga agc ccc cga   240
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80

ata aac gcc acc ggg caa ggt gtt aca ata ttt tat gtt gat aga ctt   288
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95

ggc tac tat cct tac ata gat tca atc aca gga gta act gtg aat gga   336
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110

gga atc ccc cag aag att tcc tta caa gac cat ctg gac aaa gct aag   384
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125

aaa gac att aca ttt tat atg cca gta gac aat ttg gga atg gct gtt   432
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140

att gac tgg gaa gaa tgg aga ccc act tgg gca aga aac tgg aaa cct   480
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160

aaa gat gtt tac aag aat agg tct att gaa ttg gtt cag caa caa aat   528
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
```

```
gta caa ctt agt ctc aca gag gcc act gag aaa gca aaa caa gaa ttt   576
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190

gaa aag gca ggg aag gat ttc ctg gta gag act ata aaa ttg gga aaa   624
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205

tta ctt cgg cca aat cac ttg tgg ggt tat tat ctt ttt ccg gat tgt   672
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220

tac aac cat cac tat aag aaa ccc ggt tac aat gga agt tgc ttc aat   720
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240

gta gaa ata aaa aga aat gat gat ctc agc tgg ttg tgg aat gaa agc   768
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255

act gct ctt tac cca tcc att tat ttg aac act cag cag tct cct gta   816
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270

gct gct aca ctc tat gtg cgc aat cga gtt cgg gaa gcc atc aga gtt   864
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285

tcc aaa ata cct gat gca aaa agt cca ctt ccg gtt ttt gca tat acc   912
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300

cgc ata gtt ttt act gat caa gtt ttg aaa ttc ctt tct caa gat gaa   960
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320

ctt gtg tat aca ttt ggc gaa act gtt gct ctg ggt gct tct gga att  1008
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335

gta ata tgg gga acc ctc agt ata atg cga agt atg aaa tct tgc ttg  1056
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350

ctc cta gac aat tac atg gag act ata ctg aat cct tac ata atc aac  1104
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365

gtc aca cta gca gcc aaa atg tgt agc caa gtg ctt tgc cag gag caa  1152
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380

gga gtg tgt ata agg aaa aac tgg aat tca agt gac tat ctt cac ctc  1200
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400

aac cca gat aat ttt gct att caa ctt gag aaa ggt gga aag ttc aca  1248
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415

gta cgt gga aaa ccg aca ctt gaa gac ctg gag caa ttt tct gaa aaa  1296
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430

ttt tat tgc agc tgt tat agc acc ttg agt tgt aag gag aaa gct gat  1344
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
```

```
gta aaa gac act gat gct gtt gat gtg tgt att gct gat ggt gtc tgt   1392
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460

ata gat gct ttt cta aaa cct ccc atg gag aca gaa gaa cct caa att   1440
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480

ttc tac aat gct tca ccc tcc aca ctà tct gcc aca atg ttc att gtt   1488
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
                485                 490                 495

agt att ttg ttt ctt atc att tct tct gta gcg agt ttg taa           1530
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu  *
            500                 505
```

<210> 7
<211> 509
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CARBOHYD
<222> 82, 166, 235, 254, 368, 393, 490

<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 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> 8
<211> 34
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador Inverso para gerar âncora GPI sem N483 e terminando em Y482 com local BamHI na extremidade 5'

<400> 8
aattggatcc tcagtagaaa atttgaggtt cttc 34

<210> 9
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador Inverso para gerar âncora GPI sem Y482 e terminando em F481 com local BamHI na extremidade 5'

<400> 9
aattggatcc tcagaaaatt tgaggttctt ctg 33

<210> 10
<211> 34

<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador Inverso para gerar âncora GPI sem F481 e terminando em I480 com local BamHI na extremidade 5'

<400> 10
aattggatcc tcaaatttga ggttcttctg tctc 34

<210> 11
<211> 32
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador Inverso para gerar âncora GPI sem I480 e terminando em Q479 com local BamHI na extremidade 5'

<400> 11
aattggatcc tcattgaggt tcttctgtct cc 32

<210> 12
<211> 32
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador Inverso para gerar âncora GPI sem Q479 e terminando em P478 com local BamHI na extremidade 5'

<400> 12
aattggatcc tcaaggttct tctgtctcca tg 32

<210> 13
<211> 31
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador Inverso para gerar âncora GPI sem P478 e terminando em E477 com local BamHI na extremidade 5'

<400> 13
aattggatcc tcattcttct gtctccatgg g 31

<210> 14
<211> 32
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador Directo com local de restrição NheI na extremidade 5'

<400> 14
aattgctagc atgggagtgc taaaattcaa gc 32

<210> 15
<211> 1473
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1473)
<223> sHASEGPup para P478 e marcado com His

<400> 15

```
atg gga gtg cta aaa ttc aag cac atc ttt ttc aga agc ttt gtt aaa   48
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15

tca agt gga gta tcc cag ata gtt ttc acc ttc ctt ctg att cca tgt   96
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30

tgc ttg act ctg aat ttc aga gca cct cct gtt att cca aat gtg cct   144
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45

ttc ctc tgg gcc tgg aat gcc cca agt gaa ttt tgt ctt gga aaa ttt   192
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60

gat gag cca cta gat atg agc ctc ttc tct ttc ata gga agc ccc cga   240
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80

ata aac gcc acc ggg caa ggt gtt aca ata ttt tat gtt gat aga ctt   288
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95

ggc tac tat cct tac ata gat tca atc aca gga gta act gtg aat gga   336
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110

gga atc ccc cag aag att tcc tta caa gac cat ctg gac aaa gct aag   384
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125

aaa gac att aca ttt tat atg cca gta gac aat ttg gga atg gct gtt   432
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140

att gac tgg gaa gaa tgg aga ccc act tgg gca aga aac tgg aaa cct   480
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160

aaa gat gtt tac aag aat agg tct att gaa ttg gtt cag caa caa aat   528
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175

gta caa ctt agt ctc aca gag gcc act gag aaa gca aaa caa gaa ttt   576
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190

gaa aag gca ggg aag gat ttc ctg gta gag act ata aaa ttg gga aaa   624
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205

tta ctt cgg cca aat cac ttg tgg ggt tat tat ctt ttt ccg gat tgt   672
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220

tac aac cat cac tat aag aaa ccc ggt tac aat gga agt tgc ttc aat   720
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240

gta gaa ata aaa aga aat gat gat ctc agc tgg ttg tgg aat gaa agc   768
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
```

```
act gct ctt tac cca tcc att tat ttg aac act cag cag tct cct gta   816
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270

gct gct aca ctc tat gtg cgc aat cga gtt cgg gaa gcc atc aga gtt   864
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285

tcc aaa ata cct gat gca aaa agt cca ctt ccg gtt ttt gca tat acc   912
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300

cgc ata gtt ttt act gat caa gtt ttg aaa ttc ctt tct caa gat gaa   960
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320

ctt gtg tat aca ttt ggc gaa act gtt gct ctg ggt gct tct gga att  1008
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335

gta ata tgg gga acc ctc agt ata atg cga agt atg aaa tct tgc ttg  1056
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350

ctc cta gac aat tac atg gag act ata ctg aat cct tac ata atc aac  1104
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365

gtc aca cta gca gcc aaa atg tgt agc caa gtg ctt tgc cag gag caa  1152
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380

gga gtg tgt ata agg aaa aac tgg aat tca agt gac tat ctt cac ctc  1200
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400

aac cca gat aat ttt gct att caa ctt gag aaa ggt gga aag ttc aca  1248
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415


gta cgt gga aaa ccg aca ctt gaa gac ctg gag caa ttt tct gaa aaa  1296
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430

ttt tat tgc agc tgt tat agc acc ttg agt tgt aag gag aaa gct gat  1344
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445

gta aaa gac act gat gct gtt gat gtg tgt att gct gat ggt gtc tgt  1392
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460

ata gat gct ttt cta aaa cct ccc atg gag aca gaa gaa cct gga tcc  1440
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gly Ser
465                 470                 475                 480

ggt tct ggt gct cac cat cac cat cac cat taa                     1473
Gly Ser Gly Ala His His His His His His  *
                485                 490
```

<210> 16
<211> 490
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

```
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 Gly Ser
465                 470                 475                 480
Gly Ser Gly Ala His His His His His His
                485                 490
```

<210> 17
<211> 39
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador SpacerHisFor

<400> 17
ataattggat ccggttctgg tgctcaccat caccatcac 39

<210> 18
<211> 38
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador SpacerHisRev

<400> 18
tataattgcg gccgcctaat ggtgatggtg atggtgag 38

<210> 19
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> INICIADOR INVERSO 3' SEM CODÃO STOP PARA GERAR O PRODUTO DE TRUNCAGEM HIS-sHASEGP SEM ÂNCORA GPI E TERMINANDO EM N 483

<400> 19
aatggatcca ttgtagaaaa tttgaggttc 30

<210> 20
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> INICIADOR INVERSO 3' SEM CODÃO STOP PARA GERAR O PRODUTO DE TRUNCAGEM HIS-sHASEGP SEM ÂNCORA GPI E TERMINANDO EM Y 482

<400> 20
aatggatccg tagaaaattt gaggttcttc 30

<210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> INICIADOR INVERSO 3’ SEM CODÃO STOP PARA GERAR O PRODUTO DE TRUNCAGEM HIS-sHASEGP SEM ÂNCORA GPI E TERMINANDO EM F 481

<400> 21
aattggatcc gaaaatttga ggttcttctg 30

<210> 22
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> INICIADOR INVERSO 3’ SEM CODÃO STOP PARA GERAR O PRODUTO DE TRUNCAGEM HIS-sHASEGP SEM ÂNCORA GPI E TERMINANDO EM I 480

<400> 22
attggatcca atttgaggtt cttctgtctc. 30

<210> 23
<211> 29
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> INICIADOR INVERSO 3' SEM CODÃO STOP PARA GERAR O PRODUTO DE TRUNCAGEM HIS-sHASEGP SEM ÂNCORA GPI E TERMINANDO EM Q 479

<400> 23
aattggatcc ttgaggttct tctgtctcc 29

<210> 24
<211> 29
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> INICIADOR INVERSO 3' SEM CODÃO STOP PARA GERAR O PRODUTO DE TRUNCAGEM HIS-sHASEGP SEM ÂNCORA GPI E TERMINANDO EM P 478

<400> 24
aattggatcc aggttcttct gtctccatg 29

<210> 25
<211> 28
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> INICIADOR INVERSO 3' SEM CODÃO STOP PARA GERAR O PRODUTO DE TRUNCAGEM HIS-sFIASEGP SEM ÂNCORA GPI E TERMINANDO EM E 477

<400> 25
aattggatcc ttcttctgtc tccatggg 28

<210> 26
<211> 36
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso para amplificar mutante de deleção de sHASEGP terminando em A 467

<400> 26
aattggatcc ctaagcatct atacagacac catcag 36

<210> 27
<211> 35
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso para amplificar mutante de deleção de sHASEGP terminando em A 447

<400> 27
aattggatcc ctaagctttc tccttacaac tcaag 35

<210> 28
<211> 34
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso para amplificar mutante de deleção de sHASEGP terminando em S 430

<400> 28
aattggatcc ctaagaaaat tgctccaggt cttc 34

<210> 29
<211> 36
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso para amplificar mutante de deleção de sHASEGP terminando em G 413

<400> 29
aattggatcc ctatccacct ttctcaagtt gaatag 36

<210> 30
<211> 36
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso para amplificar mutante de deleção de sHASEGP terminando em S 394

<400> 30
aattggatcc ctatgaattc cagtttttcc ttatac 36

<210> 31
<211> 35
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso para amplificar mutante de deleção de sHASEGP terminando em A 372

<400> 31
aattggatcc ctatgctagt gtgacgttga ttatg 35

<210> 32
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso para amplificar mutante de deleção de sHASEGP terminando em S 347

<400> 32
aattggatcc ctaacttcgc attatactga ggg 33

<210> 33
<211> 29
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador directo LN para mutagénese dirigida ao local para gerar fusão de sHASEGP com comando capa com L 36 como primeiro aminoácido de sHASEGP depois do comando capa

<400> 33
ctgaatttca gagcacctcc tgttattcc 29

<210> 34
<211> 28
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador directo FR para mutagénese dirigida ao local para gerar fusão de sHASEGP com comando capa com F 38 como primeiro aminoácido de sHASEGP depois do comando capa

<400> 34
ttcagagcac ctcctgttat tccaaatg 28

<210> 35
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso Asp para mutagénese dirigida ao local para gerar fusão de sHASEGP com comando capa com Asp último aminoácido do comando capa antes de L 36 ou F 38 de PH-20

<400> 35
gtcaccagtg gaacctggaa ccc 23

<210> 36
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso Gly para mutagénese dirigida ao local para gerar fusão de sHASEGP com comando capa com Gly como último aminoácido do comando capa antes de L 36 ou F 38 de PH-20

<400> 36
accagtggaa cctggaaccc agag 24

<210> 37
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador directo para o primeiro fragmento do comando capa

<400> 37
gagacagaca cactcctgct atgggtactg 30

<210> 38
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso para o primeiro fragmento do comando capa

<400> 38
cccagagcag cagtacccat agcaggagtg 30

<210> 39
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador directo para o segundo fragmento do comando capa

<400> 39
ggtactgctg ctctgggttc caggttccac 30

<210> 40
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador inverso para o segundo fragmento do comando capa

<400> 40
gcgtcaccag tggaacctgg aacccag 27

<210> 41
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador directo Nhe para comando capa

<400> 41
attgctagca tggagacaga cacactcctg 30

<210> 42
<211> 28
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador inverso EcoR1 para comando capa

<400> 42
aattgaattc gtcaccagtg gaacctgg 28

<210> 43
<211> 21

<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> sequência de comando da cadeia IgK de ratinho

<400> 43

Met	**Glu**	**Thr**	**Asp**	**Thr**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Trp**	**Val**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Trp**	**Val**	**Pro**
1				**5**				**10**					**15**		
Gly	**Ser**	**Thr**	**Gly**	**Asp**											
			20												

<210> 44
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador directo SPE 1 de comando K

<400> 44
actcactagt gctagcatgg agacagacac 30

<210> 45
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador REV MLU1 de comando K

<400> 45
aattacgcgt gaattcgtca ccagtggaac 30

<210> 46
<211> 462
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Proteína de fusão do comando capa com sHASEGP com F 38 como primeiro aminoácido do sHASEGP segregado maduro putativo (até P478)

<400> 46

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

<210> 47
<211> 40
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador 3' BAM REV de sHASEGP com âncora GPI até L 509 incluindo STOP

<400> 47
aattggatcc ctacagaaga aatgataaga aacaaaatac 40

<210> 48
<211> 1449
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

```
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt 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 tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct 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 ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactaa                                                        1449
```

<210> 49
<211> 467
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

```
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> 50
<211> 1536
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccgga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt 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 tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct 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 ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctacaatg cttcaccctc cacactatct gccacaatgt tcatttggag gctggaagtc 1500
tgggatcaag gtattagcag aattggtttc ttctga 1536

<210> 51
<211> 6630
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> vector plasmídico HZ24

<400> 51

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 ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac 540
caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc 660
cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720
tcgtttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgcg 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 tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcatg ggagtgctaa aattcaagca 1080
catcttttc agaagctttg ttaaatcaag tggagtatcc cagatagttt tcaccttcct 1140
tctgattcca tgttgcttga ctctgaattt cagagcacct cctgttattc caaatgtgcc 1200
tttcctctgg gcctggaatg ccccaagtga attttgtctt ggaaaatttg atgagccact 1260
agatatgagc ctcttctctt tcataggaag cccccgaata aacgccaccg ggcaaggtgt 1320

tacaatattt tatgttgata gacttggcta ctatccttac atagattcaa tcacaggagt 1380
aactgtgaat ggaggaatcc cccagaagat ttccttacaa gaccatctgg acaaagctaa 1440
gaaagacatt acattttata tgccagtaga caatttggga atggctgtta ttgactggga 1500
agaatggaga cccacttggg caagaaactg gaaacctaaa gatgtttaca agaataggtc 1560
tattgaattg gttcagcaac aaaatgtaca acttagtctc acagaggcca ctgagaaagc 1620
aaaacaagaa tttgaaaagg cagggaagga tttcctggta gagactataa aattgggaaa 1680
attacttcgg ccaaatcact tgtggggtta ttatcttttt ccggattgtt acaaccatca 1740
ctataagaaa cccggttaca atggaagttg cttcaatgta gaaataaaaa gaaatgatga 1800
tctcagctgg ttgtggaatg aaagcactgc tctttaccca tccatttatt tgaacactca 1860
gcagtctcct gtagctgcta cactctatgt gcgcaatcga gttcgggaag ccatcagagt 1920
ttccaaaata cctgatgcaa aaagtccact tccggttttt gcatataccc gcatagtttt 1980
tactgatcaa gttttgaaat tcctttctca agatgaactt gtgtatacat ttggcgaaac 2040
tgttgctctg ggtgctttctg gaattgtaat atggggaacc ctcagtataa tgcgaagtat 2100
gaaatcttgc ttgctcctag acaattacat ggagactata ctgaatcctt acataatcaa 2160
cgtcacacta gcagccaaaa tgtgtagcca agtgctttgc caggagcaag gagtgtgtat 2220
aaggaaaaac tggaattcaa gtgactatct tcacctcaac ccagataatt ttgctattca 2280
acttgagaaa ggtggaaagt tcacagtacg tggaaaaccg acacttgaag acctggagca 2340
attttctgaa aaattttatt gcagctgtta tagcaccttg agttgtaagg agaaagctga 2400
tgtaaaagac actgatgctg ttgatgtgtg tattgctgat ggtgtctgta tagatgcttt 2460
tctaaaacct cccatggaga cagaagaacc tcaaattttc tactgaggat ccatagctaa 2520
cgcccctctc cctccccccc ccctaacgtt actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg 2580
tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc 2640
cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtcttttccc tctcgccaaa 2700
ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga 2760
caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaacc ccccacctgg cgacaggtgc 2820
ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc 2880
cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac 2940
aaggggctga aggatgccca gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg 3000
tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac 3060
ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga tgataagctt gccacaaccc acagcggccg 3120
ctgccatcat ggttcgacca ttgaactgca tcgtcgccgt gtcccaaaat atggggattg 3180
gcaagaacgg agacctaccc tggcctccgc tcaggaacga gttcaagtac ttccaaagaa 3240
tgaccacaac ctcttcagtg gaaggtaaac agaatctggt gattatgggt aggaaaacct 3300
ggttctccat tcctgagaag aatcgacctt taaaggacag aattaatata gttctcagta 3360
gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc caaaagtttg gatgatgcct 3420
taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaagtaga catggtttgg atagtcggag 3480
gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca cctcagactc tttgtgacaa 3540
ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttcccaga aattgatttg gggaaatata 3600
aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca ggaggaaaaa ggcatcaagt 3660
ataagtttga agtctacgag aagaaagact aaacgcgtgg tacctctaga gtcgacccgg 3720
gcggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 3780
aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 3840
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 3900
tcaggggggag atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat 3960
cgataaggat ccgggctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca 4020
gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt 4080
gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 4140
gctttcttcc cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg 4200
gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4260
tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgatagа cggtttttcg ccctttgacg 4320
ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 4380
atctcggtct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 4440
aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
tcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc 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 atggtttctt 4800

agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg 4980
cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 5160
gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 5220
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact 5340
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 5400
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 5460
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 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
atatactttа gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5940
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 6000
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 6060
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 6240
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 6300
gcacacagcc cagcttggag 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> 52
<211> 2009
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 52

atgtggctca cataaattca gaaagtatga tagcagtgta ggtggttagc agcacctcat 60
aaggtccttc ctagcaaggc aaagggatgc taatgactag ccaatgctct aggaagacat 120
tgagaccagc caacttcttg ccttgataac tactgaagag acattgggtg gctggatttt 180
gaaagcagac ttctggttat aggtgatgca acttgaaaaa caatcctgaa acatgaaaca 240
agaataataa tatttaaatg taacttaatc attatacctc tttatccatc aaagtgaatt 300
cattccattc cctttcatct gtgctcatac tttgcatcag atattgggta aaccaaagtg 360
tgtaggaaga aataaatgtt ttcatagtca ttactcttta caatgggagt gctaaaattc 420
aagcacatct ttttcagaag ctttgttaaa tcaagtggag tatcccagat agttttcacc 480
ttccttctga ttccatgttg cttgactctg aatttcagag cacctcctgt tattccaaat 540
gtgcctttcc tctgggcctg gaatgcccca agtgaatttt gtcttggaaa atttgatgag 600
ccactagata tgagcctctt ctctttcata ggaagccccc gaataaacgc caccgggcaa 660
ggtgttacaa tattttatgt tgatagactt ggctactatc cttacataga ttcaatcaca 720
ggagtaactg tgaatggagg aatcccccag aagatttcct tacaagacca tctggacaaa 780
gctaagaaag acattacatt ttatatgcca gtagacaatt tgggaatggc tgttattgac 840
tgggaagaat ggagacccac ttgggcaaga aactggaaac ctaaagatgt ttacaagaat 900
aggtctattg aattggttca gcaacaaaat gtacaacttа gtctcacaga ggccactgag 960
aaagcaaaac aagaatttga aaaggcaggg aaggatttcc tggtagagac tataaaattg 1020
ggaaaattac ttcggccaaa tcacttgtgg ggttattatc tttttccgga ttgttacaac 1080
catcactata agaaacccgg ttacaatgga agttgcttca atgtagaaat aaaaagaaat 1140
gatgatctca gctggttgtg gaatgaaagc actgctcttt acccatccat ttatttgaac 1200
actcagcagt ctcctgtagc tgctacactc tatgtgcgca atcgagttcg ggaagccatc 1260
agagtttcca aaatacctga tgcaaaaagt ccacttccgg tttttgcata tacccgcata 1320
gtttttactg atcaagtttt gaaattcctt tctcaagatg aacttgtgta tacatttggc 1380
gaaactgttg ctctgggtgc ttctggaatt gtaatatggg gaaccctcag tataatgcga 1440

```
agtatgaaat cttgcttgct cctagacaat tacatggaga ctatactgaa tccttacata   1500
atcaacgtca cactagcagc caaaatgtgt agccaagtgc tttgccagga gcaaggagtg   1560
tgtataagga aaaactggaa ttcaagtgac tatcttcacc tcaacccaga taatttttgct  1620
attcaacttg agaaaggtgg aaagttcaca gtacgtggaa aaccgacact tgaagacctg   1680
gagcaatttt ctgaaaaatt ttattgcagc tgttatagca ccttgagttg taaggagaaa   1740
gctgatgtaa aagacactga tgctgttgat gtgtgtattg ctgatggtgt ctgtatagat   1800
gcttttctaa aacctcccat ggagacagaa gaaccttcaaa ttttctacaa tgcttcaccc  1860
tccacactat ctgccacaat gttcattgtt agtatttttgt ttcttatcat ttcttctgta  1920
gcgagtttgt aattgcgcag gttagctgaa atgaacaata tgtccatctt aaagtgtgct   1980
ttttcgacta attaaatctt tgaaaagaa                                     2009
```

<210> 53
<211> 2395
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

```
atgtggctca cataaattca gaaagtatga tagcagtgta ggtggttagc agcacctcat     60
aaggtccttc ctagcaaggg atgctaatga ctagccaatg ctctaggaag acattgagac    120
cagccaactt cttgccttga taactactga agagacattg ggtggctgga ttttgaaagc    180
agacttctgg ttataggtga tgcaacttga aaaacaatcc tgaaacatga aacaagaata    240
ataatattta aatgtaactt aatcattata cctctttatc catcaaagtg aattcattcc    300
attccctttc atctgtgctc atactttgca tcagatattg ggtaaaccaa agtgtgtagg    360
aagaaataaa tgttttcata gtcattactc tttacaatgg gagtgctaaa attcaagcac    420
atctttttca gaagctttgt taaatcaagt ggagtatccc agatagtttt caccttcctt    480
ctgattccat gttgcttgac tctgaatttc agagcacctc ctgttattcc aaatgtgcct    540
ttcctctggg cctggaatgc cccaagtgaa ttttgtcttg gaaaatttga tgagccacta    600
gatatgagcc tcttctcttt cataggaagc ccccgaataa acgccaccgg gcaaggtgtt    660
acaatatttt atgttgatag acttggctac tatccttaca tagattcaat cacaggagta    720
actgtgaatg gaggaatccc ccagaagatt tccttacaag accatctgga caaagctaag    780
aaagacatta cattttatat gccagtagac aatttgggaa tggctgttat tgactgggaa    840
gaatggagac ccacttgggc aagaaactgg aaacctaaag atgtttacaa gaataggtct    900
attgaattgg ttcagcaaca aaatgtacaa cttagtctca cagaggccac tgagaaagca    960
aaacaagaat ttgaaaaggc agggaaggat ttcctggtag agactataaa attgggaaaa   1020
ttacttcggc caaatcactt gtggggttat tatcttttc cggattgtta caaccatcac   1080
tataagaaac ccggttacaa tggaagttgc ttcaatgtag aaataaaaag aaatgatgat   1140
ctcagctggt tgtggaatga aagcactgct ctttacccat ccatttattt gaacactcag   1200
cagtctcctg tagctgctac actctatgtg cgcaatcgag ttcgggaagc catcagagtt   1260
tccaaaatac ctgatgcaaa aagtccactt ccggttttg catatacccg catagttttt     1320
actgatcaag ttttgaaatt cctttctcaa gatgaacttg tgtatacatt tggcgaaact   1380
gttgctctgg gtgcttctgg aattgtaata tggggaaccc tcagtataat gcgaagtatg   1440
aaatcttgct tgctcctaga caattacatg gagactatac tgaatcctta cataatcaac   1500
gtcacactag cagccaaaat gtgtagccaa gtgctttgcc aggagcaagg agtgtgtata   1560
aggaaaaact ggaattcaag tgactatctt cacctcaacc cagataattt tgctattcaa   1620
cttgagaaag gtggaaagtt cacagtacgt ggaaaaccga cacttgaaga cctggagcaa   1680
ttttctgaaa aattttattg cagctgttat agcaccttga gttgtaagga gaaagctgat   1740
gtaaaagaca ctgatgctgt tgatgtgtgt attgctgatg gtgtctgtat agatgctttt   1800
ctaaaacctc ccatggagac agaagaacct caaatttttct acaatgcttc accctccaca   1860
ctatctgcca caatgttcat ttggaggctg gaagtctggg atcaaggtat tagcagaatt   1920
ggtttcttct gagagtcatg agggaaaaat gtgtttcagg cctcttccct tggcttacag   1980
gaaatgaaaa aaccatgact atcatcacca acatccttgg gtattaagtg cagtcactct   2040
cctagatgct gtgggggagaa ggcaagttac aaagatagac cttccctcaa gataatcaga   2100
ttttcatggt attatcctta acctttttga catcatggag gctttgggaa tctgatgaag   2160
cctatcaatt ttcttccaga agatatttat ataagattat aagaaaaatt atgtacacag   2220
cttatttttat tgcattggat caaaatgcca tttataaaga attatgcctt ttccatcaat   2280
tttagcatgg aaaaataatt tcaggcaata tgcttaaaaa ttgggggaag acaaaagaaa   2340
tccatatcgt gtaaataaaa ataaattttg gttttgctca aaaaaaaaaa aaaaa         2395
```

Lisboa, 2015-04-17

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido de hialuronidase substancialmente purificado, em que:

o polipéptido contém pelo menos uma porção açúcar que está ligada covalentemente a um resíduo de asparagina (N) do polipéptido;

o polipéptido é activo em meio neutro;

o polipéptido consiste numa sequência de aminoácidos que possui pelo menos 98% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos representada pelos aminoácidos 1-448 de SEQ ID NO:4; e

o polipéptido é solúvel.

2. Polipéptido de hialuronidase substancialmente purificado da reivindicação 1, em que: o polipéptido é codificado por uma molécula de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 terminando num resíduo de aminoácido C-terminal que é o aminoácido 477, 478, 479, 480, 481, 482 ou 483 de SEQ ID NO:1.

3. Polipéptido de hialuronidase substancialmente purificado da reivindicação 1 ou da reivindicação 2 que está modificado com um polímero.

4. Polipéptido de hialuronidase substancialmente purificado da reivindicação 3, em que o polímero é PEG ou dextrano.

5. Método para produção de um polipéptido de hialuronidase substancialmente purificado da reivindicação 1 ou da reivindicação 2,

o método compreendendo:

a introdução de um ácido nucleico que codifica um polipéptido da reivindicação 1 ou da reivindicação 2, ligado operativamente a um promotor adequado, no interior de uma célula capaz de incorporar porções açúcar ligadas a N no polipéptido;

a cultura da célula sob condições nas quais o polipéptido codificado é expresso pela célula e segregado; e

a recuperação do polipéptido expresso.

6. Método da reivindicação 5, compreendendo a purificação do polipéptido.

7. Método da reivindicação 5 ou da reivindicação 6, em que o ácido nucleico consiste na sequência de nucleótidos 106-1446 de SEQ ID NO:6, ou numa sua porção, que codificam um polipéptido cataliticamente activo; ou

a molécula de ácido nucleico consiste na sequência de nucleótidos apresentada em SEQ ID NO:48, ou seus codões degenerados.

8. Método de qualquer uma das reivindicações 5-7, em que a célula é uma célula eucariota.

9. Método da reivindicação 8, em que a célula eucariota é seleccionada entre uma célula de mamífero, uma célula de insecto ou uma célula de levedura.

10. Método de qualquer uma das reivindicações 5-9, em que a célula é uma célula de ovário de *hamster* chinês (CHO).

11. Método de qualquer uma das reivindicações 5-10, em que o ácido nucleico está ligado a ácido nucleico que codifica um sinal de secreção para secreção do polipéptido codificado.

12. Composição farmacêutica, compreendendo o polipéptido de hialuronidase substancialmente purificado de qualquer uma das reivindicações 1-4.

13. Composição farmacêutica da reivindicação 12, compreendendo adicionalmente um agente farmaceuticamente activo.

14. Composição farmacêutica da reivindicação 13, em que o agente farmaceuticamente activo é seleccionado entre um agente quimioterapêutico, um agente analgésico, um agente anti-inflamatório, um agente antimicrobiano, um agente amebicida, um agente tricomonacida, um agente anti-parkinsoniano, um agente antimalárico, um agente anticonvulsivo, um agente antidepressivo, um agente antiartrítico, um agente antifúngico, um agente anti-hipertensor, um agente antipirético, um agente

antiparasitário, um agente anti-histamínico, um agente agonista alfa-adrenérgico, um agente bloqueador alfa, um agente anestésico, um agente broncodilatador, um agente biocida, um agente bactericida, um agente bacteriostático, um agente bloqueador beta-adrenérgico, um agente bloqueador dos canais do cálcio, um agente fármaco cardiovascular, um agente contraceptivo, um agente descongestionante, um agente diurético, um agente depressivo, um agente de diagnóstico, um agente electrólito, um agente hipnótico, um agente hormonal, um agente hiperglicémico, um agente relaxante muscular, um agente contractor muscular, um agente oftálmico, um agente parassimpatomimético, um agente energético psíquico, um agente sedativo, um agente simpatomimético, um agente tranquilizante, um agente urinário, um agente vaginal, um agente viricida, um agente vitamínico, um agente anti-inflamatório não esteróide, um agente inibidor da enzima de conversão da angiotensina, um polipéptido, uma proteína, um ácido nucleico, um fármaco, uma molécula orgânica e um indutor do sono.

15. Composição farmacêutica compreendendo o polipéptido de hialuronidase de qualquer uma das reivindicações 1-4 para utilização na administração de uma molécula terapêutica.

16. Composição farmacêutica, compreendendo o polipéptido de hialuronidase de qualquer uma das reivindicações 1-4 para utilização na remoção de um excesso de glicosaminoglicanos ou glicosaminoglicanos acumulados para tratamento de uma doença ou distúrbio.

17. Composição farmacêutica da reivindicação 16, em que o excesso de glicosaminoglicanos ocorre após isquemia-reperfusão, inflamação, arteriosclerose, edema, cancro, lesão da medula espinal ou cicatrização.

18. Composição farmacêutica da reivindicação 12 para utilização no tratamento de um tumor, em que a composição compreende adicionalmente um agente anticanceroso seleccionado entre um quimioterapêutico, um anticorpo, um péptido, um vector de terapia génica, um vírus ou uma molécula de ADN.

19. Composição farmacêutica da reivindicação 18 para utilização no tratamento de um tumor, em que o agente anticanceroso é um anticorpo.

20. Composição farmacêutica da reivindicação 19 para utilização no tratamento de um tumor, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

21. Composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações 19 ou 20, para utilização no tratamento de um tumor, em que o tumor é um cancro da mama.

Lisboa, 2015-04-17

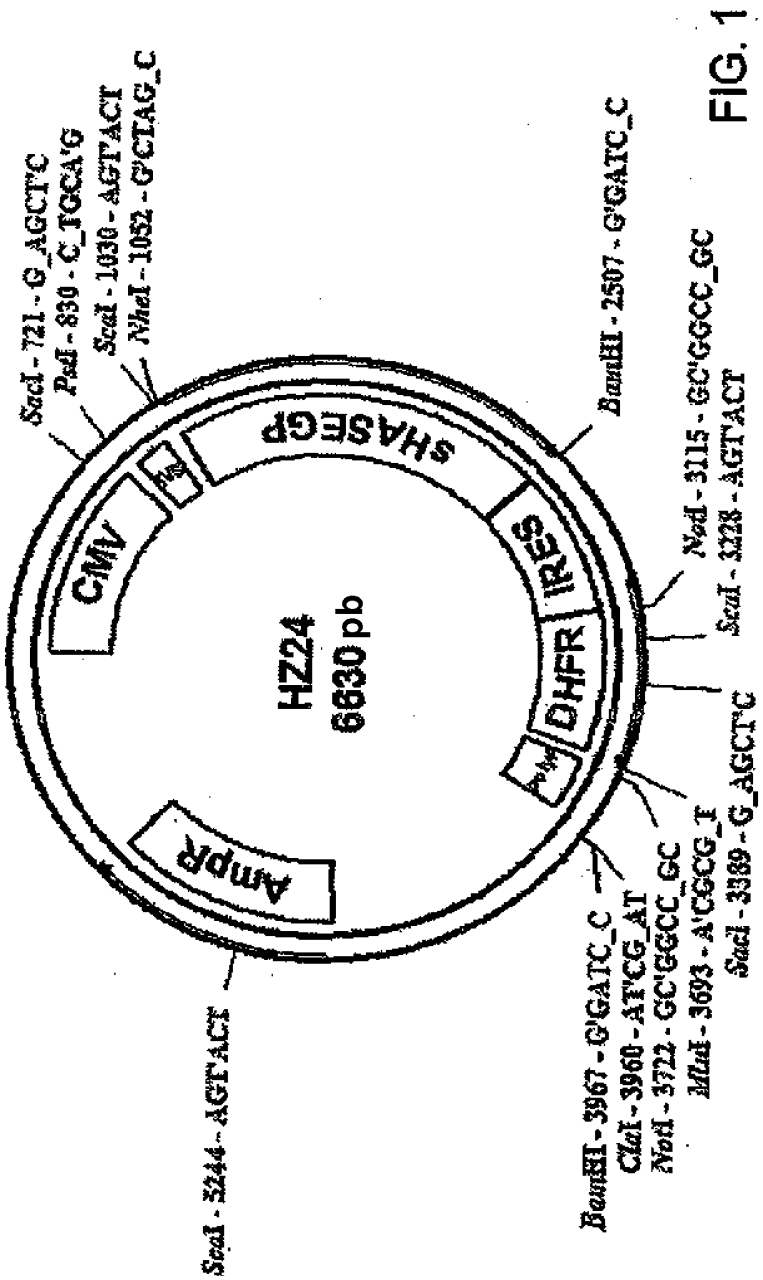
HZ24
6630 pb
CMV
sHASEGP
IRES
DHFR
AmpR
SacI - 721 - G_AGCT'C
PsiI - 830 - C_TGCA'G
SpeI - 1030 - AGT'ACT
NheI - 1052 - G'CTAG_C
BamHI - 2507 - G'GATC_C
NotI - 3115 - GC'GGCC_GC
SpeI - 3228 - AGT'ACT
SacI - 3389 - G_AGCT'C
MluI - 3693 - A'CGCG_T
NotI - 3722 - GC'GGCC_GC
ClaI - 3960 - AT'CG_AT
BamHI - 3967 - G'GATC_C
SpeI - 3244 - AGT'ACT

FIG. 1