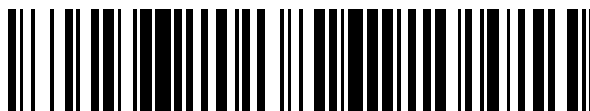


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 478**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2010 E 10760140 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2477603**

54 Título: **Coformulación estable de hialuronidasa e inmunoglobulina, y métodos de uso de la misma**

30 Prioridad:

17.09.2009 US 277045 P

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

27.07.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TESCHNER, WOLFGANG;
SVATOS, SONJA;
BRUCKSCHWAIGER, LEOPOLD;
WEBER, ALFRED;
SCHWARZ, HANS-PETER y
LEI, LAURA

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 578 478 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Coformulación estable de hialuronidasa e inmunoglobulina, y métodos de uso de la misma

5 Campo de la invención

Se proporcionan en el presente documento coformulaciones estables de inmunoglobulina y hialuronidasa que son estables frente al almacenamiento en forma líquida a temperatura ambiente durante al menos 6 meses y a temperaturas de nevera convencionales durante 1-2 años. Tales coformulaciones pueden usarse en métodos de tratamiento de enfermedades o estados que pueden tratarse con IG mediante administración subcutánea.

Antecedentes

Los productos de inmunoglobulina (IG) a partir de plasma humano se usaron por primera vez en 1952 para tratar la inmunodeficiencia. Inicialmente, administraciones intramusculares o subcutáneas de IG fueron los métodos de elección. Sin embargo, para inyectar mayores cantidades de IG necesarias para el tratamiento eficaz de diversas enfermedades, se desarrollaron productos administrables por vía intravenosa con IG de concentración inferior (50 mg/ml). La administración intravenosa (i.v.) de inmunoglobulina (IGIV) es el tratamiento primario de individuos con inmunodeficiencias. Aunque las preparaciones de IGIV iniciales provocaban efectos secundarios graves, las preparaciones de IGIV disponibles en la actualidad se toleran bien en la mayoría de los pacientes inmunodeficientes. No obstante, una pequeña proporción de pacientes sigue teniendo reacciones desagradables, incluso incapacitantes, tales como cefalea, fatiga y mialgia. La fiebre y los escalofríos siguen siendo un problema, especialmente cuando los pacientes tienen infecciones intercurrentes. Las reacciones persisten a menudo a pesar de probar otras preparaciones de IGIV o premedicar con paracetamol, difenhidramina y corticosteroides. Además, debido al requisito de la administración i.v., hay problemas con el cumplimiento de los pacientes.

La administración subcutánea (s.c.) de inmunoglobulina es una alternativa a la administración intravenosa. En comparación con infusiones i.v., la administración s.c. de inmunoglobulina tiene varias ventajas. Por ejemplo, reduce la incidencia de reacciones sistémicas, no requiere el acceso i.v. algunas veces difícil, mejora los niveles valle y proporciona a los pacientes más independencia.

Para el uso terapéutico de cualquier preparación de IG, otra consideración importante en los productos de IG es su estabilidad durante el almacenamiento. La manipulación y administración seguras de formulaciones que contienen proteínas representan desafíos significativos para los formuladores farmacéuticos. Las proteínas tienen propiedades físicas y químicas únicas que presentan problemas de estabilidad: existen una variedad de rutas de degradación para las proteínas, lo que implica inestabilidad tanto química como física. La inestabilidad química incluye desaminación, agregación, corte de la estructura principal peptídica y oxidación de residuos de metionina. La inestabilidad física engloba muchos fenómenos, incluyendo, por ejemplo, agregación. Por tanto, hay una necesidad de formulaciones estables de preparaciones de inmunoglobulina.

Sumario

Se proporcionan en el presente documento composiciones, métodos y kits para la administración subcutánea de coformulaciones líquidas, estables para tratar enfermedades y estados que pueden tratarse con IG. Se proporcionan composiciones de coformulaciones líquidas, estables formuladas para administración subcutánea, que contienen inmunoglobulina (IG) a una concentración que es de al menos el 10% p/v, una hialuronidasa soluble a una concentración que es de al menos 50 U/ml y está presente a una razón de al menos 100 unidades/gramo (U/g) de IG, NaCl a una concentración de al menos 50 mM y un pH de entre 4 y 5. La coformulación es estable a 28°C-32°C durante al menos 6 meses.

Además, puede estar presente un estabilizador de aminoácido, por ejemplo, alanina, histidina, arginina, lisina, ornitina, isoleucina, valina, metionina, glicina o prolina. En algunos ejemplos, el aminoácido está presente en una cantidad que es de al menos 100 mM. En un ejemplo, el aminoácido es glicina y está presente en una cantidad que es o es de al menos 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM o más. En otro ejemplo, la glicina está en una cantidad que es de 250 mM.

Las coformulaciones líquidas, estables proporcionadas en el presente documento contienen IG a al menos el 10% al 22%, por ejemplo el 10% p/v, el 11% p/v, el 12% p/v, el 13% p/v, el 14% p/v, el 15% p/v, el 16% p/v, el 17% p/v, el 18% p/v, el 19% p/v, el 20% p/v, el 21% p/v, el 22% p/v o más. En algunos ejemplos, la IG es el 10% p/v o el 20% p/v. La IG usada en las coformulaciones es de plasma humano, por ejemplo, puede purificarse a partir de plasma humano tal como mediante fraccionamiento con alcohol. En algunos ejemplos, la IG se purifica adicionalmente mediante una cualquiera o más de una modificación química, incubación a pH 4,0 con o sin pepsina, precipitación con polietilenglicol (PEG), cromatografía de intercambio iónico, escisión enzimática, tratamiento con disolvente/detergente, diafiltración o ultrafiltración. Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden emplear IG que contiene IgG, IgA e IgM. En algunos ejemplos, la IG contiene más del 95% de IgG.

Además, las coformulaciones pueden contener NaCl. En algunos ejemplos, el NaCl está a una concentración de 50 mM a 220 mM, por ejemplo, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 210 mM, 220 mM o más. En un ejemplo, el NaCl está a una concentración de 150 mM.

Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen una hialuronidasa soluble que puede ser PH20, o una forma truncada de la misma. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede ser una PH20 ovina, bovina o humana truncada. En algunos ejemplos cuando la PH20 es una PH20 humana truncada, la PH20 humana truncada puede seleccionarse de entre polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de las mismas. En un ejemplo, la hialuronidasa soluble es rHuPH20.

Además, la hialuronidasa soluble puede estar a una concentración que es de 50 U/ml a 500 U/ml, por ejemplo 50 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml o más. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede estar a una concentración que es de 100 U/ml o 300 U/ml. En las coformulaciones proporcionadas en el presente documento, la hialuronidasa soluble puede estar presente a una razón de 100 U/g de IG a 5000 U/g de IG, por ejemplo, 100 U/g de IG, 150 U/g de IG, 200 U/g de IG, 250 U/g de IG, 300 U/g de IG, 400 U/g de IG, 500 U/g de IG, 600 U/g de IG, 700 U/g de IG, 800 U/g de IG, 900 U/g de IG, 1000 U/g de IG, 1200 U/g de IG, 1500 U/g de IG, 1800 U/g de IG, 2000 U/g de IG, 3000 U/g de IG, 4000 U/g de IG, 5000 U/g de IG o más. En algunos ejemplos la hialuronidasa soluble está a una razón de 500 U/g de IG, 1000 U/g de IG, 1500 U/g de IG o 3000 U/g de IG. El pH de las coformulaciones puede ser de 4,4 a 4,9 en forma concentrada.

Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden formularse para administración de dosificación múltiple o administración de dosificación individual. Además, en ejemplos en los que la coformulación es para administración de dosificación individual, la IG está en una cantidad suficiente para tratar una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG. La IG puede administrarse diariamente, semanalmente, bisemanalmente, cada 2-3 semanas, cada 3-4 semanas o mensualmente para el tratamiento de una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG. La administración de la coformulación se efectúa de manera que la cantidad de IG administrada es sustancialmente igual que la cantidad en una administración de dosificación individual cuando se administra por vía intravenosa para el tratamiento de una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG. En algunos ejemplos la cantidad de IG en la coformulación puede ser de aproximadamente 1 gramo (g) a 200 g, por ejemplo, 1 gramo (g), 2 g, 3 g, 4 g, 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g o 200 g. Además, la cantidad de hialuronidasa en la composición puede ser de aproximadamente 500 unidades a 100.000 unidades, por ejemplo, 500 unidades, 1000 unidades, 2000 unidades, 5000 unidades, 10.000 unidades, 30.000 unidades, 40.000 unidades, 50.000 unidades, 60.000 unidades, 70.000 unidades, 80.000 unidades, 90.000 unidades, 100.000 unidades o más.

Las coformulaciones líquidas proporcionadas en el presente documento son estables a 28°C-32°C durante de al menos 6 meses a un año, por ejemplo, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses o más. Las coformulaciones líquidas son estables adicionalmente a 0°C-10°C durante de al menos 6 meses a 2 años, por ejemplo, 6 meses, 1 año, 2 años o más.

También se proporciona en el presente documento un kit que contiene cualquiera de las coformulaciones líquidas, estables proporcionadas en el presente documento, y opcionalmente instrucciones para su uso.

Se proporcionan en el presente documento recipientes que contienen las coformulaciones líquidas, estables proporcionadas en el presente documento. El recipiente puede ser un tubo, una botella, un vial o una jeringa. En ejemplos en los que el recipiente es una jeringa, el recipiente comprende además una aguja para inyección. Por tanto, los recipientes proporcionados en el presente documento contienen las coformulaciones líquidas, estables para administración de dosificación individual o administración de dosificación múltiple.

Se proporcionan en el presente documento métodos de tratamiento de enfermedades o estados que pueden tratarse con IG, mediante administración subcutánea a un sujeto de una coformulación líquida, estable que contiene una hialuronidasa soluble e IG. La coformulación se administra de manera que la cantidad de IG administrada es sustancialmente igual que la cantidad cuando se administra por vía intravenosa para el tratamiento de una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG.

Además, los métodos proporcionados en el presente documento son para tratar una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG, seleccionado de entre enfermedades de inmunodeficiencia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia secundaria, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias e infecciones agudas.

En algunos ejemplos, las coformulaciones pueden administrarse usando los métodos proporcionados en el presente documento para tratar una enfermedad de inmunodeficiencia primaria. La enfermedad de inmunodeficiencia primaria puede ser inmunodeficiencia variable común (CVID), deficiencia de IgA selectiva, deficiencia de subclases de IgG, deficiencia de anticuerpos específicos, trastornos del complemento, agammaglobulinemia congénita, ataxia telangiectasia, hiper-IgM, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada grave (SCID), hipogammaglobulinemia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos,

agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA) o hipogammaglobulinemia de la infancia.

En otros ejemplos, la enfermedad o el estado que puede tratarse con IG es una enfermedad de inmunodeficiencia adquirida secundaria a tumores malignos hematológicos. El tumor maligno hematológico puede seleccionarse de entre leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM) y linfoma no Hodgkin (NHL).

En casos en los que la enfermedad o el estado que puede tratarse con IG es una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, la enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria puede seleccionarse de entre enfermedad de Kawasaki, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillain-Barre, púrpura trombocitopénica idiopática, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, neuropatía motora multifocal, miastenia grave y síndrome de Moersch-Woltman.

En algunos ejemplos la coformulación se administra para tratar una infección bacteriana, viral o fúngica aguda, tal como, por ejemplo, *Haemophilus influenzae* de tipo B; *Pseudomonas aeruginosa* de tipos A y B; *Staphylococcus aureus*; estreptococos del grupo B; *Streptococcus pneumoniae* de tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19 y 23; adenovirus de tipos 2 y 5; citomegalovirus; virus de Epstein-Barr VCA; virus de la hepatitis A; virus de la hepatitis B; virus del herpes simple 1; virus del herpes simple 2; influenza A; sarampión; parainfluenza de tipos 1, 2 y 3; polio; virus de la varicela zóster; *Aspergillus*; y *Candida albicans*.

Además, la enfermedad o el estado que puede tratarse con IG puede seleccionarse de entre inmunodeficiencia iatrogénica; encefalomiелitis diseminada aguda; vasculitis necrotizante sistémica positiva para ANCA; anemia hemolítica autoinmunitaria; penfigoide ampolloso; penfigoide cicatricial; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria con trombocitopenia inmunitaria); trombocitopenia aloinmunitaria feto-materna/neonatal (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatía paraproteínica de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia mioclónica opsoclónica; pénfigo foliáceo; pénfigo vulgar; púrpura tras transfusión; necrólisis epidérmica tóxica/Síndrome de Steven Johnson (DIEZ/SJS); síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso sistémico; mieloma múltiple; septicemia; tumores de células B; degeneración cerebelosa paraneoplásica sin anticuerpos; y trasplante de médula ósea.

Descripción detallada

Visión general

A. Definiciones

B. Coformulaciones estables de inmunoglobulina (IG) y hialuronidasa

1. Terapia con inmunoglobulinas

2. Administración subcutánea de formulaciones de inmunoglobulina y hialuronidasa

3. Coformulaciones estables

C. Inmunoglobulina y preparación de inmunoglobulina

1. Preparación y purificación

a. Método de Cohn-Oncley

b. Procedimientos de Cohn-Oncley modificados

c. Procesamiento viral

d. Concentración de proteínas

e. Preparaciones de IG a modo de ejemplo

i. IG al 10%

ii. Preparaciones de IG de alta concentración (por ejemplo IG al 20%)

2. Estabilidad en almacenamiento

a. Excipientes de estabilización de proteínas

b. pH

D. Hialuronidasa

5 1. PH20

2. Hialuronidasa soluble

10 a. PH20 humana soluble

b. PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20)

3. Glicosilación

15 4. Modificación de hialuronidasas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas

E. Métodos de producción de ácidos nucleicos que codifican para una hialuronidasa soluble y polipéptidos de la misma

20 1. Vectores y células

2. Expresión

25 a. Células procariotas

b. Células de levadura

c. Células de insecto

30 d. Células de mamífero

e. Plantas

3. Técnicas de purificación

35

F. Preparación, formulación y administración de inmunoglobulinas y polipéptidos de hialuronidasa solubles

1. Formulaciones y dosificaciones

40 a. Inmunoglobulina

b. Hialuronidasa

c. Cloruro de sodio

45

d. Estabilizador de aminoácido

e. Otros agentes

50 2. Formas de dosificación

3. Administración

G. Métodos de evaluación de la actividad, estabilidad, biodisponibilidad y farmacocinética

55

1. Tamaño molecular

2. Actividad biológica

60 a. Inmunoglobulina

b. Hialuronidasa

1. Farmacocinética y tolerabilidad

65

H. Métodos de tratamiento y usos terapéuticos

1. Inmunodeficiencia primaria y secundaria

a. Inmunodeficiencia primaria

b. Inmunodeficiencia secundaria

2. Enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias

a. Enfermedad de Kawasaki

b. Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica

c. Síndrome de Guillain-Barre

d. Púrpura trombocitopénica idiopática

e. Miopatías inflamatorias

i. Dermatomiositis

ii. Polimiositis

iii. Miositis por cuerpos de inclusión

f. Síndrome miasténico de Lambert-Eaton

g. Neuropatía motora multifocal

h. Miastenia grave

i. Síndrome de Moersch-Woltmann

3. Infecciones agudas

4. Otras enfermedades y estados

I. Artículos de fabricación y kits

J. Ejemplos

A. DEFINICIONES

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la(s) invención/inventiones. Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes publicadas y publicaciones, secuencias de Genbank, bases de datos, sitios web y otros materiales publicados a los que se hace referencia a lo largo de toda la divulgación en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, se incorporan como referencia en su totalidad. En el caso en el que haya una pluralidad de definiciones para términos en el presente documento, prevalecen las de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de este tipo, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y la información particular en Internet puede ir y venir, pero puede encontrarse información equivalente buscando en Internet. La referencia a la misma demuestra la disponibilidad y diseminación pública de tal información.

Tal como se usa en el presente documento, "inmunoglobulina," "globulina inmunitaria", "gammaglobulina" se refieren a preparaciones de proteínas plasmáticas derivadas del plasma reunido de donantes adultos. Predominan anticuerpos IgG; están presentes otras subclases de anticuerpos, tales como IgA e IgM. La inmunoglobulina terapéutica puede proporcionar inmunización pasiva aumentando los niveles en suero de anticuerpos circulantes. Los anticuerpos IgG, por ejemplo, pueden unirse a y neutralizar toxinas bacterianas; opsonizar patógenos; activar el complemento; y suprimir citocinas patógenas y fagocitos a través de la interacción con citocinas y receptores de las mismas, tales como CD5, interleucina-1a (IL-1a), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) y receptores de células T. La inmunoglobulina terapéutica puede inhibir la actividad de autoanticuerpos. Las preparaciones de inmunoglobulina también incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulina intravenosa (IGIV), inmunoglobulina i.v., inmunoglobulina terapéutica. Se conocen bien preparaciones de inmunoglobulina, e incluyen nombres comerciales, tales como BayGam®, Gamimune® N, Gammagard® S/D, Gammar®-P, Iveegam® EN, Panglobulin®, Polygam® S/D, Sandoglobulin®, Venoglobulin®-I, Venoglobulin®-S, WinRho® SDF y otros. Las

preparaciones de inmunoglobulina pueden derivarse de plasma humano, o se producen de manera recombinante.

Tal como se usa en el presente documento, tratamiento de "IgG intravenosa" o "IGIV" se refiere generalmente a un método terapéutico de administración por vía intravenosa de una composición de inmunoglobulinas IgG a un paciente para tratar varios estados tales como inmunodeficiencias, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias. Las inmunoglobulinas IgG se reúnen y preparan normalmente a partir de plasma. Pueden usarse anticuerpos completos o fragmentos.

Tal como se usa en el presente documento, enfermedades o estados que pueden tratarse con IG se refieren a cualquier enfermedad o estado para el que se usan preparaciones de inmunoglobulina. Tales enfermedades y estados, incluyen, pero no se limitan a, cualquier enfermedad en la que un aumento en anticuerpos circulantes es paliativo, tal como, por ejemplo, inmunodeficiencia; hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a tumores malignos hematológicos; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; miastenia grave; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogammaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomiелitis diseminada aguda; vasculitis necrotizante sistémica positiva para ANCA; anemia hemolítica autoinmunitaria; penfigoide ampolloso; penfigoide cicatricial; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria con trombocitopenia inmunitaria); trombocitopenia aloinmunitaria feto-materna/neonatal (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatía paraproteínica de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia mioclónica opsoclónica; pénfigo foliáceo; pénfigo vulgar; púrpura tras transfusión; necrólisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (DIEZ/SJS); síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso sistémico; mieloma múltiple; septicemia; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

Tal como se usa en el presente documento, temperatura ambiente se refiere a un intervalo generalmente de desde aproximadamente 0 a 18°C hasta aproximadamente 0 a 32°C. Los expertos en la técnica aprecian que la temperatura ambiente varía según la ubicación y las condiciones prevalentes. Por ejemplo, las temperaturas ambiente pueden ser superiores en climas más cálidos tales como Italia o Texas.

Tal como se usa en el presente documento, "estable" o "estabilidad" con referencia a una coformulación proporcionada en el presente documento se refiere a una en la que la(s) proteína(s) (IG y hialuronidasa) en la misma conservan esencialmente su integridad y estabilidad física y química tras el almacenamiento durante al menos seis meses a temperaturas de hasta 32°C. Para los fines en el presente documento, "estabilidad a temperatura ambiente" significa estabilidad en el intervalo superior de temperaturas ambiente típicas para lugares más cálidos (es decir 28-32°C para Italia o Texas). Las formulaciones son estables a lo largo del intervalo de temperaturas ambiente y refrigeradas, es decir, 0 - 32°C, o hasta 32°C durante al menos seis meses. Cada una de las IG y hialuronidasa presenta estabilidad en la coformulación tras el almacenamiento durante al menos seis meses a temperatura ambiente, incluyendo temperaturas hasta o aproximadamente 32°C. Un experto en la técnica conoce bien ensayos para evaluar la estabilidad de cada una y se describen en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, estabilidad de IG significa que la IG no se agrega, desnaturaliza o fragmenta sustancialmente de manera que al menos el 90% de la IG está presente como monómeros u oligo-/dímeros, con un peso molecular de IG de entre o aproximadamente mayor de 70 kDa y menos de < 450 kDa. Por tanto, menos de aproximadamente el 10%, por ejemplo, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2%, menos de aproximadamente el 1% de la proteína IG está presente como agregado (es decir tiene un tamaño molecular mayor de o igual a 450 kDa de tamaño) en la formulación. De manera similar, no más del 5% al 7%, por ejemplo, el 7%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2%, el 1% o el 0,5% o menos de la IG en la coformulación está fragmentada (es decir, tiene un tamaño molecular menor de 70 kDa).

Tal como se usa en el presente documento, estabilidad de la hialuronidasa significa que conserva al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o más de la actividad hialuronidasa original antes del almacenamiento. Un experto en la técnica conoce ensayos para evaluar la actividad hialuronidasa y se describen en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, "almacenamiento" significa que una formulación no se administra inmediatamente a un sujeto una vez preparada, sino que se mantiene durante un periodo de tiempo en condiciones particulares (por ejemplo temperatura particular; forma líquida o liofilizada) antes de su uso. Por ejemplo, una formulación líquida puede mantenerse durante días, semanas, meses o años, generalmente al menos seis meses, antes de su administración a un sujeto a temperaturas variadas tales como refrigerada (de 0° a 10°C) o temperatura ambiente (por ejemplo temperatura hasta 32°C).

Tal como se usa en el presente documento, régimen de dosificación se refiere a la cantidad de inmunoglobulina administrada y la frecuencia de administración. El régimen de dosificación es una función de la enfermedad o el estado que va a tratarse, y por tanto puede variar.

Tal como se usa en el presente documento, “sustancialmente igual que un régimen de dosificación de IG intravenosa (IGIV)” se refiere a un régimen en el que la dosis y/o frecuencia está dentro de una cantidad que es eficaz para tratar una enfermedad o un estado particular, normalmente es de aproximadamente el 10%, de la dosis o frecuencia i.v. Las cantidades de IGIV que son eficaces para tratar una enfermedad o un estado particular se conocen o pueden determinarse empíricamente por un experto en la técnica. Por ejemplo, tal como se ejemplifica más adelante, de 300 mg/kg (es decir 21 gramos suponiendo que el adulto promedio pesa 70 kg) a 600 mg/kg (es decir 42 gramos) es la dosis mensual típica de IGIV administrada a pacientes que tienen enfermedades de inmunodeficiencia primaria. Por tanto, IG, cuando se administra en combinación con hialuronidasa, se administra por vía subcutánea a dosis que son o son aproximadamente de 300 mg/kg a 600 mg/kg para el tratamiento de enfermedades de inmunodeficiencia primaria.

Tal como se usa en el presente documento, frecuencia de administración se refiere al tiempo entre dosis sucesivas de inmunoglobulina. Por ejemplo, la frecuencia puede ser una, dos, tres, cuatro semanas, y es una función de la enfermedad o el estado particular tratado. Generalmente, la frecuencia es de al menos cada dos o tres semanas, y normalmente no más de una vez al mes.

Tal como se usa en el presente documento, hialuronidasa se refiere a una enzima que degrada ácido hialurónico. Las hialuronidasas incluyen hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36), y hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas también incluyen cualquiera de origen no humano incluyendo, pero sin limitarse a, murina, canina, felina, leporina, aviar, bovina, ovina, porcina, equina, de peces, de ranas, bacteriana, y cualquier forma de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas no humanas a modo de ejemplo incluyen hialuronidasas de vacas (SEQ ID NO: 10 y 11), avispa de chaqueta amarilla (SEQ ID NO: 12 y 13), abeja melífera (SEQ ID NO: 14), avispón de cara blanca (SEQ ID NO: 15), avispa del papel (SEQ ID NO: 16), ratón (SEQ ID NO: 17-19, 32), cerdo (SEQ ID NO: 20-21), rata (SEQ ID NO: 22-24, 31), conejo (SEQ ID NO: 25), oveja (SEQ ID NO: 26 y 27), orangután (SEQ ID NO: 28), mono cynomolgus (SEQ ID NO: 29), cobaya (SEQ ID NO: 30), *Staphylococcus aureus* (SEQ ID NO: 33), *Streptococcus pyogenes* (SEQ ID NO: 34) y *Clostridium perfringens* (SEQ ID NO: 35). Las hialuronidasas también incluyen las de origen humano. Las hialuronidasas humanas a modo de ejemplo incluyen HYAL1 (SEQ ID NO: 36), HYAL2 (SEQ ID NO: 37), HYAL3 (SEQ ID NO: 38), HYAL4 (SEQ ID NO: 39) y PH20 (SEQ ID NO: 1). También se incluyen entre las hialuronidasas solubles, incluyendo, PH20 ovina y bovina, PH20 humana soluble y rHuPH20 soluble.

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

Tal como se usa en el presente documento, una hialuronidasa soluble se refiere a un polipéptido caracterizado por su solubilidad en condiciones fisiológicas. Generalmente, una hialuronidasa soluble carece de toda o una parte del anclaje de glicofosfatidilo (GPI), o por lo demás no se ancla suficientemente a la membrana celular. Por tanto, tras la expresión a partir de una célula, se secreta una hialuronidasa soluble al medio. Las hialuronidasas solubles pueden distinguirse, por ejemplo, por su reparto en la fase acuosa de una disolución de Triton X-114 calentada hasta 37°C (Bordier *et al.*, (1981) J. Biol. Chem., 256: 1604-7). Las hialuronidasas ancladas a la membrana, tales como hialuronidasas ancladas a lípidos, se repartirán en la fase rica en detergente, pero se repartirán en la fase acuosa o pobre en detergente tras el tratamiento con fosfolipasa C. Se incluyen entre las hialuronidasas solubles hialuronidasas ancladas a la membrana en las que una o más regiones asociadas con el anclaje de la hialuronidasa a la membrana se han retirado o modificado, en donde la forma soluble conserva la actividad hialuronidasa. Las hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas solubles recombinantes y las contenidas en o purificadas a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, extractos de testículos de ovejas o vacas. A modo de ejemplo de tales hialuronidasas solubles son PH20 humanas solubles. Otras hialuronidasas solubles incluyen PH20 ovina (SEQ ID NO: 27) y bovina (SEQ ID NO: 11).

Tal como se usa en el presente documento, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluye polipéptidos maduros que carecen de todo o una parte del sitio de unión a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C-terminal de manera que tras la expresión, los polipéptidos son solubles. Los polipéptidos de sHuPH20 a modo de ejemplo incluyen polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de SEQ ID NO: 4-9 y 47-48. Los polipéptidos precursores para tales polipéptidos de sHuPH20 a modo de ejemplo incluyen una secuencia señal. A modo de ejemplo de los precursores son los expuestos en SEQ ID NO: 3 y 40-46, cada uno de los cuales contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en las posiciones de aminoácido 1-35. Los polipéptidos de HuPH20 soluble también incluyen los que degradan durante o después de los métodos de producción y purificación

descritos en el presente documento.

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

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

Tal como se usa en el presente documento, actividad hialuronidasa se refiere a la capacidad de la hialuronidasa para escindir ácido hialurónico. Se conocen en la técnica ensayos *in vitro* para determinar la actividad hialuronidasa de hialuronidasas, tales como rHuPH20 soluble, y se describen en el presente documento. Los ensayos a modo de ejemplo incluyen el ensayo de microturbidez descrito más adelante (véase por ejemplo el ejemplo 3) que mide la escisión de ácido hialurónico por hialuronidasa indirectamente detectando el precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico no escindido se une a albúmina sérica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ultrafiltración (UF)” engloba una variedad de métodos de filtración por membrana en los que la presión hidrostática empuja un líquido contra una membrana semipermeable. Se retienen los solutos y sólidos suspendidos de alto peso molecular, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. Este proceso de separación se usa a menudo para purificar y concentrar disoluciones macromoleculares (10^3 - 10^6 Da), especialmente disoluciones de proteína. Están disponibles varias membranas de ultrafiltración dependiendo del tamaño de las moléculas que retienen. La ultrafiltración se caracteriza normalmente por un tamaño de poro de membrana de entre 1 y 1000 kDa y presiones de funcionamiento de entre 0,01 y 10 bar, y es particularmente útil para separar coloides como proteínas de moléculas pequeñas como azúcares y sales.

Tal como se usa en el presente documento, el término “diafiltración” se realiza con las mismas membranas que la ultrafiltración y es una filtración de flujo tangencial. Durante la diafiltración, se introduce tampón en el tanque de recirculación al tiempo que se retira el filtrado de la operación unitaria. En procesos en los que el producto está en el material retenido (por ejemplo IgG), la diafiltración extrae por lavado componentes del conjunto de productos al filtrado, intercambiando de ese modo los tampones y reduciendo la concentración de especies no deseadas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “mezclado” describe un acto de producir una distribución igual de dos o más compuestos o sustancias distintas en una disolución o suspensión mediante cualquier forma de agitación. No se requiere una distribución igual por completo de todos los componentes en una disolución o suspensión como resultado del “mezclado” tal como se usa el término en esta solicitud.

Tal como se usa en el presente documento, el término “disolvente” engloba cualquier sustancia líquida que pueda disolver o dispersar una o más otras sustancias. Un disolvente puede ser de naturaleza inorgánica, tal como agua, o puede ser un líquido orgánico, tal como etanol, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo, hexano; éter de petróleo, etc. Tal como se usa en el término “tratamiento con detergente disolvente”, disolvente incide un disolvente orgánico (por ejemplo, fosfato de tri-N-butilo), que es parte de la mezcla de detergentes disolventes usada para inactivar virus con envuelta lipídica en disolución.

Tal como se usa en el presente documento, el término “detergente” se usa en esta solicitud de manera intercambiable con el término “tensioactivo” o “agente que actúa en la superficie”. Los tensioactivos son normalmente compuestos orgánicos que son anfífilos, es decir, que contienen tanto grupos hidrófobos (“colas”) como grupos hidrófilos (“cabezas”), que hacen que los tensioactivos sean solubles tanto en disolventes orgánicos como en agua. Un tensioactivo puede clasificarse por la presencia de grupos formalmente cargados en su cabeza. Un tensioactivo no iónico no tiene grupos de carga en su cabeza, mientras que un tensioactivo iónico porta una carga neta en su cabeza. Un tensioactivo zwitteriónico contiene una cabeza con dos grupos cargados de manera opuesta. Algunos ejemplos de tensioactivos comunes incluyen: aniónicos (basados en aniones sulfato, sulfonato o carboxilato): perfluorooctanoato (PFOA o PFO), perfluorooctanosulfonato (PFOS), dodecilsulfato de sodio (SDS),

laurilsulfato de amonio, y otras sales de alquilsulfato, laureth sulfato de sodio (también conocido como lauril éter sulfato de sodio, o SLES), alquilbencenosulfonato; catiónicos (basados en cationes de amonio cuaternario): bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) también conocido como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, y otras sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio (CPC), amina de sebo polietoxilado (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de benzetonio (BZT); zwitteriónicos (anfóteros): dodecilbetaína; cocamidopropilbetaína; cocoamfoglucinato; no iónicos: alquilpoli(óxido de etileno), alquilfenolpoli(óxido de etileno), copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) (disponibles comercialmente poloxámeros o poloxaminas), poliglucósidos de alquilo, incluyendo glucósido de octilo, maltósido de decilo, alcoholes grasos (por ejemplo, alcohol cetílico y alcohol oleílico), cocamida MEA, cocamida DEA, polisorbatos (Tween 20, Tween 80, etc.), detergentes de Triton, y óxido de dodecildimetilamina.

Tal como se usa en el presente documento, los residuos de α -aminoácidos que se producen de manera natural son los residuos de los 20 α -aminoácidos encontrados en la naturaleza que se incorporan en proteínas mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm relacionado en humanos.

Tal como se usa en el presente documento, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser mono o bicatenarios. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están marcados opcionalmente, tal como con un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente o radiomarcador, se contemplan moléculas monocatenarias. Tales moléculas tienen normalmente una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (normalmente menos de 5, generalmente menos de 3) para estudiar con sonda o cebar una biblioteca. Generalmente, una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 ó 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria a o idéntica a un gen de interés. Las sondas y los cebadores pueden tener 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.

Tal como se usa en el presente documento, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene de desde 2 hasta 40 aminoácidos de longitud.

Tal como se usa en el presente documento, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento se identifican según sus abreviaturas conocidas de tres letras o una letra (Tabla 1). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones convencionales de una única letra usadas de manera rutinaria en la técnica.

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

Tal como se usa en el presente documento, "residuo de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los residuos de aminoácido descritos en el presente documento están en la forma isomérica "L". Los residuos en la forma isomérica "D", que se designan así, pueden sustituirse por cualquier residuo de L-aminoácido siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada. NH_2 se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo carboxilo terminal de un polipéptido. Conforme con la nomenclatura de polipéptidos convencional descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y adoptada en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, en la tabla 1 se muestran las abreviaturas para residuos de aminoácido:

Tabla 1 - Tabla de correspondencia

SÍMBOLO		
1 letra	3 letras	AMINOÁCIDO
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina

Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

Debe indicarse que todas las secuencias de residuos de aminoácido representadas en el presente documento por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de extremo amino-terminal a carboxilo-terminal. Además, se define que la frase “residuo de aminoácido” incluye los aminoácidos enumerados en la tabla de correspondencia (tabla 1) y aminoácidos modificados y poco comunes, tales como a los que se hace referencia en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, y que se incorpora en el presente documento como referencia. Además, debe indicarse que un guión al comienzo o al final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico con una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácido, con un grupo amino-terminal tal como NH₂ o con un grupo carboxilo-terminal tal como COOH.

Tal como se usa en el presente documento, “aminoácidos que se producen de manera natural” se refieren a los 20 L-aminoácidos que aparecen en polipéptidos.

Tal como se usa en el presente documento, “aminoácido no natural” se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura similar a un aminoácido natural pero que se ha modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Los aminoácidos que no se producen de manera natural incluyen por tanto, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos que se producen de manera natural e incluyen, pero no se limitan a, los isoestereómeros D de aminoácidos. Se describen aminoácidos no naturales a modo de ejemplo en el presente documento y los conocen los expertos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, una mezcla isocinética es una en la que las razones molares de aminoácidos se han ajustado basándose en sus tasas de reacción notificadas (véase, por ejemplo, Ostresh *et al.*, (1994) Biopolymers 34: 1681).

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

Tal como se usa en el presente documento, los expertos en esta técnica conocen sustituciones conservativas adecuadas de aminoácidos y pueden hacerse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson *et al.* Molecular Biology of the Gene, 4ª edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p. 224). Tales sustituciones pueden hacerse de acuerdo con lo expuesto en la tabla 1A tal como sigue:

TABLA 1A

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

Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Otras sustituciones también son permisibles y pueden determinarse empíricamente o según sustituciones conservativas conocidas.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, un constructo de ADN es una molécula de ADN lineal o circular, mono o bicatenaria que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera no encontrada en la naturaleza. Los constructos de ADN existen como resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, un segmento de ADN es una parte de una molécula de ADN mayor que tiene atributos especificados. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica para un polipéptido especificado es una parte de una molécula de ADN más larga, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee en el sentido de 5' a 3', codifica para la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término polinucleótido significa un polímero mono o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótido leídas desde el extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se proporciona en el presente documento en cuanto a nucleótidos (abreviado "nt") o pares de bases (abreviado "pb"). El término nucleótidos se usa para moléculas mono o bicatenarias cuando el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, se usa para indicar la longitud global y se entenderá que es equivalente al término pares de bases. Los expertos en la técnica reconocerán que las dos hebras de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos del mismo pueden estar en bisel; por tanto todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido bicatenaria pueden no estar apareados. Tales extremos no apareados, en general, no superarán 20 nucleótidos de longitud.

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

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

50 Tal como se usa en el presente documento, homólogo (con respecto a secuencias de ácido nucleico y/o de aminoácidos) significa una homología de secuencia aproximadamente mayor de o igual al 25%, normalmente una homología de secuencia mayor de o igual al 25%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95%; el porcentaje preciso puede especificarse si es necesario. Para fines en el presente documento, los términos "homología" e "identidad" se usan a menudo de manera intercambiable, a menos que se indique lo contrario. En general, para la determinación del porcentaje de homología o identidad, se alinean secuencias de modo que se obtenga la coincidencia de orden más alto (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carillo *et al.* (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Mediante la homología de secuencia, se determina el número de aminoácidos conservados mediante programas de algoritmos de alineación convencionales, y pueden usarse con

penalizaciones por hueco por defecto establecidas por cada proveedor. Moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas hibridarían normalmente con rigurosidad moderada o con alta rigurosidad a lo largo de toda la longitud del ácido nucleico de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico de hibridación.

Si dos cualesquiera moléculas tienen secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que son "idénticas" u "homólogas" al 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% puede determinarse usando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FASTA", usando por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al.*, J Mol Biol 215:403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo *et al.* (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por ejemplo, puede usarse la función BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information para determinar la identidad. Otros programas disponibles comercial o públicamente incluyen el programa DNASTar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa "Gap" del University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) (Madison WI). El porcentaje de homología o identidad de moléculas de proteínas y/o ácido nucleico puede determinarse, por ejemplo, comparando la información de secuencia usando un programa informático GAP (por ejemplo, Needleman *et al.* (1970) J. Mol. Biol. 48:443, tal como se revisa por Smith y Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482). En resumen, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, dividido entre el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para las identidades y de 0 para las no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov *et al.* (1986) Nucl. Acids Res. 14:6745, tal como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización de 0,10 adicional para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos terminales.

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

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, "se hibrida específicamente" se refiere al apareamiento, mediante apareamiento de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo un oligonucleótido) con una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la técnica están familiarizados con parámetros *in vitro* e *in*

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

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

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, variantes de especie se refiere a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamífero, tales como ratón y humano.

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

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

Tal como se usa en el presente documento, proteína o polipéptido purificado o aislado o parte biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido del que se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Puede determinarse que las preparaciones están sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables tal como se determina mediante métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía en capa fina (CCF), electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), usados por los expertos en la técnica para evaluar tal pureza, o que son suficientemente puras de manera que la purificación adicional no alteraría de manera detectable las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la técnica conocen métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente puros químicamente. Sin embargo, un compuesto sustancialmente puro químicamente, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

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

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

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

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

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, operablemente u operativamente unido cuando se hace referencia a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan en concierto para sus fines previstos, por ejemplo, inicio de la transcripción en el promotor y avanza a través del segmento codificante hasta el terminador.

Tal como se usa en el presente documento, el término evaluar pretende incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteína, tal como una enzima o proteasa, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también de obtener un índice, una razón, un porcentaje, un valor visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y por supuesto no es necesario que la especie química realmente detectada sea el producto final de una reacción, tal como un producto de proteólisis de la misma, sino que puede ser por ejemplo un derivado de la misma o alguna sustancia adicional. Por ejemplo, la evaluación puede ser detección de un producto de escisión de una proteína, tal como mediante SDS-PAGE y tinción de proteínas con azul de Coomassie.

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

prueba o usar tales actividades. Por tanto, para fines en el presente documento, una actividad biológica de una proteasa es su actividad catalítica en la que se hidroliza un polipéptido.

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más artículos. La combinación puede ser dos o más artículos separados, tales como dos composiciones o dos colecciones, puede ser una mezcla de los mismos, tal como una única mezcla de los dos o más artículos, o cualquier variación de los mismos. Los elementos de una combinación están generalmente asociados o relacionados funcionalmente.

Tal como se usa en el presente documento, un kit es una combinación envasada que incluye opcionalmente otros elementos, tales como reactivos adicionales e instrucciones para el uso de la combinación o elementos de la misma.

Tal como se usa en el presente documento, “enfermedad o trastorno” se refiere a un estado patológico en un organismo que resulta de una causa o un estado que incluye, pero no se limita a, infecciones, estados adquiridos, estados genéticos, y caracterizado por síntomas identificables. Las enfermedades y los trastornos de interés en el presente documento son los que pueden tratarse mediante inmunoglobulina.

Tal como se usa en el presente documento, “tratar” un sujeto con una enfermedad o un estado significa que los síntomas del sujeto se alivian parcial o totalmente, o permanecen estáticos tras el tratamiento. Por tanto tratamiento engloba profilaxis, terapia y/o cura. Profilaxis se refiere a la prevención de una posible enfermedad y/o a una prevención del empeoramiento de síntomas o la progresión de una enfermedad. Tratamiento también engloba cualquier uso farmacéutico de una preparación de inmunoglobulina y composiciones proporcionadas en el presente documento.

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

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, un paciente se refiere a un sujeto humano.

Tal como se usa en el presente documento, mejora de los síntomas de una enfermedad o un trastorno particular mediante un tratamiento, tal como mediante administración de una composición farmacéutica u otro producto

terapéutico, se refiere a cualquier reducción, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que puede atribuirse a o asociarse con la administración de la composición o producto terapéutico.

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

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

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

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

20 Tal como se usa en el presente documento, un "artículo de fabricación" es un producto que se fabrica y se vende. Tal como se usa a lo largo de esta solicitud, el término pretende englobar composiciones de IG y hialuronidasa contenidas en artículos de envasado.

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

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

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

35 Tal como se usa en el presente documento, animal incluye cualquier animal, tal como, pero sin limitarse a primates incluyendo humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves, tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; ovinos, tales como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen humanos como el animal contemplado. Las enzimas proporcionadas en el presente documento proceden de cualquier fuente, animal, planta, organismo procariota y fúngico. La mayoría de las enzimas son de origen animal, incluyendo origen de mamífero.

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

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

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

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

60 Tal como se usa en el presente documento, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácido y otros compuestos, a menos que se indique lo contrario, están de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas o la Comisión de la IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (véase, (1972) Biochem. 11:1726).

B. COFORMULACIONES ESTABLES DE INMUNOGLOBULINA (IG) Y HIALURONIDASA

65 Se proporcionan en el presente documento coformulaciones estables que contienen inmunoglobulina (IG) y hialuronidasa. Las coformulaciones conservan la distribución de tamaño molecular de IG y la actividad hialuronidasa tras el almacenamiento prolongado en forma líquida a temperatura ambiente (por ejemplo de 28 a 32°C) durante al

menos seis meses. Generalmente, las coformulaciones también conservan la distribución de tamaño molecular de IG y la actividad hialuronidasa a temperaturas de nevera convencionales durante al menos 1-2 años. Las coformulaciones pueden usarse para tratar enfermedades y estados que pueden tratarse con IG. En particular, las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento se formulan para administración subcutánea.

1. Terapia con inmunoglobulina

La inmunoglobulina es un producto terapéutico que se administra principalmente para tratar individuos con inmunodeficiencias. Los trastornos de deficiencia de inmunoglobulina son un subconjunto de enfermedades de inmunodeficiencia caracterizadas por niveles ausentes o reducidos de inmunoglobulinas séricas, que conducen a un aumento de la susceptibilidad a infecciones bacterianas, especialmente del tracto sinopulmonar. Las enfermedades de inmunodeficiencia son o bien primarias (genéticas) o bien secundarias (adquiridas). Las enfermedades de inmunodeficiencia primaria son poco comunes e incluyen agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, delección de cadena pesada de inmunoglobulina, deficiencia de subclase de inmunoglobulina G (IgG) selectiva, inmunodeficiencia variable común o síndrome de hiperinmunoglobulina M ligado al cromosoma X. También se han encontrado niveles de inmunoglobulina disminuidos en individuos que tienen inmunodeficiencias combinadas debidas a defectos en células T y B, tales como, pero sin limitarse a, inmunodeficiencia combinada grave o síndrome de Wiskott Aldrich (IUIS Scientific Committee, 1999). Más comunes son inmunodeficiencias secundarias, inducidas por factores que incluyen, pero no se limitan a, malnutrición, virus, envejecimiento y leucemia. Los individuos con estas enfermedades requieren terapia de sustitución con productos de inmunoglobulina para prevenir o reducir la gravedad de las infecciones.

La terapia de sustitución con inmunoglobulina se usó por primera vez en 1952 y se administró por vía intramuscular y por vía subcutánea. Sin embargo, para tratar eficazmente la enfermedad, son necesarias mayores cantidades de IG, lo que condujo al desarrollo de productos administrables por vía intravenosa con menores concentraciones de IG (50-100 mg/ml). Desde 1981, la mayoría de los productos de inmunoglobulina disponibles en los Estados Unidos se administran por vía intravenosa. Generalmente, las preparaciones de IG son productos estériles, purificados que contienen inmunoglobulina G (IgG, IgM, IgA o una combinación de esas). Normalmente, los productos de IG contienen el 95-99% de IgG y sólo cantidades traza de inmunoglobulinas A (IgA), M (IgM), D (IgD) y E (IgE). Las preparaciones de IG para administración i.v. se formulan generalmente a del 3 al 12% de IG.

Más recientemente, se han desarrollado preparaciones de inmunoglobulina para administración subcutánea (Gardulf *et al.* (2006) *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 6: 434-42; Gardulf *et al.* (2006) *J. Clin. Immunol.* 26: 177-85; Ochs *et al.* (2006) *J. Clin. Immunol.* 26: 265-73), y al menos un producto, Vivaglobin[®], se autorizó para administración subcutánea en los Estados Unidos. Una vía de administración subcutánea de IG tiene varias ventajas en comparación con la vía i.v. tales como mejor tolerabilidad y la posibilidad de tratamiento de atención domiciliaria.

La biodisponibilidad de la inmunoglobulina administrada por vía subcutánea generalmente es inferior a la de la infundida por vía intravenosa. Tras la administración i.v., la inmunoglobulina está inmediatamente disponible en la sangre, y se equilibra lentamente con el compartimento extravascular a lo largo de 3 a 5 días (Schiff *et al.* (1986) *J. Clin. Immunol.* 6: 256-64). La inmunoglobulina administrada por vía subcutánea se absorbe lentamente desde el espacio subcutáneo a la sangre y al mismo tiempo se equilibra con el compartimento extravascular; no hay un pico i.v. alto. La biodisponibilidad no se ha estudiado de manera extensa, pero en un ensayo reciente de la preparación ZLB-Behring (es decir, Vivaglobin[®]), se determinó midiendo el área bajo la curva (AUC) que sólo se absorbía el 67% de la inmunoglobulina, y por tanto, la dosis recomendada era el 137% de la dosis i.v. (Ochs *et al.* (2006) *J. Clin. Immunol.* 26: 265-73). A pesar de las dificultades técnicas de comparar la AUC para dos vías y frecuencia de administración diferentes, los estudios de inmunoglobulina administrada por vía intradérmica en conejos sugieren que hay una disminución de la biodisponibilidad a través de la vía subcutánea. Esto puede deberse al modo de absorción de moléculas de proteína grandes, que no pueden difundir fácilmente a través de las paredes capilares y deben absorberse por medio del sistema linfático (Supersaxo *et al.* (1990) *Pharm. Res.* 7: 167-9).

Todas las preparaciones de inmunoglobulina usadas actualmente para administración subcutánea se formulan al 16% de IG, en comparación con preparaciones de IGIV formuladas a del 5 al 12% de IG. La mayor concentración de IG en preparaciones subcutáneas en relación con preparaciones i.v. permite volúmenes de infusión más pequeños; tales preparaciones no pueden infundirse por vía intravenosa. Se considera que tales métodos subcutáneos de terapia de sustitución con inmunoglobulina son eficaces, seguros y también altamente apreciados por los pacientes, ya que tienen un bajo riesgo de reacciones adversas sistémicas y conducen a concentraciones de IgG en suero valle superiores en comparación con infusiones i.v. mensuales (Gardulf *et al.* (1995) *J. Adv. Nurs.*, 21: 917-27; Gardulf *et al.* (1993) *Clin. Exp. Immunol.*, 92: 200-4; Gardulf *et al.* (1991) *Lancet*, 338: 162-6).

Además de la disminución de biodisponibilidad asociada con la administración subcutánea de IG, otra distinción entre administración s.c. e i.v. es que sólo pueden infundirse pequeños volúmenes por vía subcutánea en cada sitio, necesitándose el uso de múltiples sitios en una base semanal o bisemanal (cada dos semanas). En general, sin embargo, a los adultos sólo puede infundirseles 20-40 ml en un único sitio subcutáneo, con volúmenes inferiores por sitio para niños. Actualmente, la práctica aceptada para la administración de IG es de 300-600 mg/kg por vía intravenosa una vez cada 3-4 semanas o 100-200 mg/kg/semana por vía subcutánea (Berger (2008) *Immunol.*

Allergy Clin. North Am. 28(2): 413-438). Por tanto, se administran hasta 15 g de IG por semana por vía subcutánea. Esto significa que se requiere la administración de una preparación del 16-20% de IG al menos en 3 sitios por semana. Aun cuando la administración semanal o bisemanal tiene la ventaja añadida de mantener mejores niveles valle que infusiones i.v. mensuales, el requisito de múltiples inserciones de agujas ha disuadido a muchos pacientes.

No obstante, los métodos subcutáneos de terapia de sustitución con inmunoglobulina están convirtiéndose en una alternativa cada vez más popular para la terapia con IGIV. Los pacientes que tienen reacciones graves frente a infusiones de IGIV pueden tolerar a menudo IG administrada por vía subcutánea. Se considera que la administración subcutánea es eficaz, segura y altamente apreciada por los pacientes, ya que tiene un bajo riesgo de reacciones adversas sistémicas y pueden administrarse en el hogar o en el hospital (Gardulf *et al.* (1995) J. Adv. Nurs. 21: 917-27; Gardulf *et al.* (1993) Clin. Exp. Immunol. 92: 200-4; Gardulf *et al.* (1991) Lancet 338: 162-6).

2. Administración subcutánea de formulaciones de inmunoglobulina y hialuronidasa

La biodisponibilidad de IG administrada por vía subcutánea aumenta en combinación con la administración de hialuronidasa, permitiendo de ese modo la administración subcutánea de inmunoglobulina a dosificaciones y frecuencias similares al tratamiento con IGIV (véase por ejemplo la solicitud de patente estadounidense n.º 2010-0074885 y el documento PCT internacional n.º WO 2009-117085, cada uno incorporado como referencia en el presente documento). El espacio subcutáneo (s.c.), formado por una red de colágeno llena de ácido hialurónico, una sustancia similar a un gel, es en gran medida responsable de la resistencia al flujo de fluido a través de los tejidos. La hialuronidasa es una familia de enzimas que se producen de manera natural que descomponen el ácido hialurónico, que es una sustancia similar a un "gel" que llena el espacio que se encuentra en la matriz extracelular y en tejidos por todo el cuerpo tal como la piel y el ojo. La hialuronidasa actúa dividiendo el enlace glucosaminídico en el ácido hialurónico entre el C₁ de un resto N-acetilglucosamina y C₄ de un resto glucurónico. Esto disminuye temporalmente la viscosidad del cemento celular y promueve la difusión de fluidos inyectados, facilitando así su absorción. Después de eso, el ácido hialurónico se regenera de manera natural en el plazo de 24 horas. Por consiguiente, las características de biodisponibilidad, farmacocinética y/o farmacodinámica de coformulaciones que contienen hialuronidasa mejoran. Basándose en experimentos en animales, el aumento de la dispersión de fluido permite la administración de hasta 1 l por hora por medio de la vía subcutánea, que es una velocidad de flujo similar a la vía i.v.

En presencia de hialuronidasa, la biodisponibilidad de IG administrada por vía subcutánea aumenta, normalmente hasta más del 90% de la biodisponibilidad de IG tras el tratamiento con IGIV. Además, la coadministración con una hialuronidasa soluble permite la infusión de grandes volúmenes en un único sitio subcutáneo. Por ejemplo, pueden administrarse volúmenes de hasta 600 ml o mayores de IG en un único sitio en una única sesión, por ejemplo pueden administrarse 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml o más en un único sitio en una única administración. Por ejemplo, una preparación de IG formulada a o entre el 5-12%, por ejemplo al 10% de proteína, que normalmente se usa sólo para terapia con IGIV puede coadministrarse por vía subcutánea con una hialuronidasa soluble a dosificaciones equivalentes a dosis de IGIV de una vez al mes, por ejemplo, a o aproximadamente 100 mg/kg, 200 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg, 500 mg/kg, 600 mg/kg o más. Preparaciones de IG a concentraciones superiores de proteína, por ejemplo, el 12-25% de IG tal como el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 21%, el 22% o más también pueden administrarse por vía subcutánea en presencia de hialuronidasa. Las dosificaciones pueden administrarse como una dosis individual o pueden dividirse en múltiples dosis administradas diaria o semanalmente, tal como una vez a la semana o cada dos, tres o cuatro semanas o combinaciones de las mismas. Por tanto, la IG, cuando se administra por vía subcutánea en presencia de hialuronidasa, puede administrarse una vez al mes a dosis de IGIV prevalentes para la indicación particular. Además, debido a que la hialuronidasa actúa abriendo canales de flujo en la piel, puede acelerar las velocidades de infusión. Por tanto, la administración por vía subcutánea de IG administrada con hialuronidasa aumenta las velocidades de infusión y disminuye de ese modo el tiempo de administración de la terapia con IG.

Administrando IG por vía subcutánea en presencia de una hialuronidasa, se abordan una o todas las consideraciones y los problemas asociados con la administración subcutánea de IG. Por tanto, en virtud de las propiedades de dispersión de la hialuronidasa, la administración por vía subcutánea de IG en presencia de una hialuronidasa soluble permite la administración de dosis de IGIV a frecuencias de IGIV de una vez al mes, al tiempo que se mantiene la biodisponibilidad de IGIV.

3. Coformulaciones estables

Puesto que las preparaciones de inmunoglobulina administrables por vía subcutánea tienen las ventajas de tratamiento de atención domiciliaria, se contempla una preparación estable, lista para usar de IG y hialuronidasa. Las proteínas usadas para la terapia se someten normalmente a una variedad de condiciones durante el procesamiento y almacenamiento, incluyendo bajo pH, fluctuaciones en temperatura, diversos componentes de tampón y fuerzas iónicas y, a menudo, alta concentración de proteína en la preparación final. Sin embargo, para que sea eficaz, la coformulación debe conservar suficiente actividad de la IG y hialuronidasa. Por tanto, una coformulación de IG y hialuronidasa debe proporcionarse como una disolución estable para su almacenamiento como una disolución acuosa sin deteriorarse durante periodos de tiempo prolongados. Por tanto, se proporciona en

el presente documento una coformulación líquida estable de IG y hialuronidasa. La coformulación es tal que se proporciona como una forma de dosificación que puede usarse para inyección directa, es decir sin diluirse antes de su uso.

Se encontró en el presente documento que un producto coformulado preparado mediante la adición de una hialuronidasa designada rHuPH20 a una preparación de IG antes de su administración no era estable a temperatura ambiente. La adición de sal mejora la estabilidad de la formulación, en particular, manteniendo la actividad de la hialuronidasa en la formulación. Por tanto, además de contener una cantidad eficaz de IG y hialuronidasa, las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento también contienen al menos 50 mM de una sal de cloruro de metal alcalino, por ejemplo, NaCl o KCl. Normalmente, las coformulaciones estables también contienen un aminoácido, por ejemplo glicina, como estabilizador y se proporcionan a un pH de aproximadamente 0 a de 4 a 5. En general, la razón de hialuronidasa con respecto a IG en un producto coformulado es mayor que la razón cuando los mismos productos (IG y hialuronidasa) y la misma cantidad de IG se administran por vía subcutánea por separado, por ejemplo, en una administración de vanguardia.

Generalmente, la coformulación estable es una formulación líquida. El almacenamiento de la coformulación directamente en una forma líquida se aprovecha de la conveniencia de tener estabilidad en almacenamiento en forma líquida, facilidad de administración sin reconstitución y capacidad para suministrar la formulación en jeringas precargadas, listas para usar o como preparaciones de múltiples dosis. Por tanto las coformulaciones líquidas proporcionan una preparación lista para usar de IG y hialuronidasa para administración subcutánea a un sujeto sin tener que reconstituir la preparación de manera precisa y aséptica y esperar durante un periodo de tiempo hasta que la disolución se clarifique antes de administrar la formulación al sujeto. Se simplifica el procedimiento de administración de la formulación a un sujeto para un profesional sanitario. Además, el procedimiento de fabricación de las formulaciones líquidas se simplifica y es más eficaz que el procedimiento de fabricación para la versión liofilizada porque todas las fases de la fabricación de las formulaciones líquidas se llevan a cabo en una disolución acuosa, sin implicar un procedimiento de secado, tal como liofilización y secado por congelación. Por consiguiente, también es más rentable. La coformulación estable puede proporcionarse como una disolución líquida en un recipiente o jeringa. Una coformulación de este tipo puede dispensarse convenientemente a humanos u otras especies de mamífero como un producto farmacéutico sin reconstitución adicional por el médico o paciente.

Además, debido a su alta estabilidad durante el almacenamiento, las coformulaciones pueden contener altas concentraciones de proteína en el intervalo de aproximadamente el 10% al 22% de IG, tal como del 10% al 20% de IG sin provocar ningún efecto adverso sobre la(s) actividad(es) biológica(s) de IG debido a agregación y/o fragmentación de proteínas durante un almacenamiento prolongado. Tal estabilidad no sólo garantiza la eficacia de la coformulación de IG, sino que también reduce posibles riesgos de provocar efectos adversos en un sujeto. Por tanto, las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento conservan la actividad enzimática hialuronidasa y la actividad de IG al tiempo que minimizan la autoasociación y agregación de IG. Generalmente, la actividad se conserva a una temperatura que es de hasta 32°C, por ejemplo a 0 de aproximadamente 0°C a 32°C, generalmente a 0 de aproximadamente 28°C a 32°C. La estabilidad de la coformulación se mantiene a lo largo de periodos de tiempo prolongados, por ejemplo, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o más. Las coformulaciones tienen la ventaja de que son estables en forma líquida durante el almacenamiento durante periodos de tiempo prolongados de al menos 6 meses. En un ejemplo, las coformulaciones estables son estables en líquido durante al menos 1 año o más, por ejemplo, de 1 año a 2 años, tal como 1 año, 2 años, o más a temperaturas de nevera convencionales (aproximadamente 4±2°C, o aproximadamente 2-8°C o, más generalmente, que oscilan entre aproximadamente 0-10°C). En otro ejemplo, las coformulaciones son estables en forma líquida durante el almacenamiento a temperatura ambiente (en el intervalo de 18-32°C, por ejemplo, de 28°C a 32°C) durante al menos seis meses. Por ejemplo, las coformulaciones estables tienen generalmente una semivida de al menos 0 de aproximadamente 6 meses a 18 meses, por ejemplo 6 meses, 12 meses, 18 meses, o más cuando se almacenan a temperatura ambiente.

Las siguientes secciones describen las formulaciones proporcionadas en el presente documento, incluyendo inmunoglobulinas y hialuronidasas a modo de ejemplo en las formulaciones, métodos de prepararlas, y métodos de usar las coformulaciones estables para tratar enfermedades y estados que pueden tratarse con IG.

C. INMUNOGLOBULINA Y PREPARACIÓN DE INMUNOGLOBULINA

Se proporcionan en el presente documento inmunoglobulinas (IG, también denominadas inmunoglobulina, gammaglobulina o IgG) que pueden formularse en composiciones estables con hialuronidasa. Las coformulaciones estables pueden usarse para su uso en el tratamiento de enfermedades y estados que pueden tratarse con IG.

Las inmunoglobulinas son proteínas gammaglobulina producidas por el sistema inmunitario humoral y que se encuentran en el plasma de animales superiores. La IG actúa fortaleciendo el sistema inmunitario modulando la actividad del complemento, suprimiendo la producción de anticuerpos, saturando o bloqueando receptores de Fc en macrófagos y linfocitos B, y suprimiendo la producción de mediadores inflamatorios tales como citocinas, quimiocinas y metaloproteinasas. Las IG se componen de cinco clases, o isotipos, de anticuerpos (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) y diversas subclases, cada una con especificidades variables. IgG es la clase más predominante de IG

encontrada en la sangre y es importante en respuestas inmunitarias secundarias y en la protección de tejidos frente a la infección. La tabla 2 ilustra cantidades típicas de inmunoglobulinas encontradas en el suero, aunque las preparaciones de IG para tratamiento pueden emplear etapas de purificación para alterar las razones de una clase o subclase de inmunoglobulina particular. Por ejemplo, puede usarse cromatografía con proteína A, proteína G o proteína H Sepharose para enriquecer una mezcla de inmunoglobulinas en IgG, o en subtipos de IgG específicos (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; patente estadounidense n.º 5.180.810).

Tabla 2. Inmunoglobulina sérica

Clase de Ig	Nivel en suero mg/ml (%)	Función
IgG	1200 (77)	Clase de IG principal en humanos; respuesta inmunitaria secundaria; protege frente a la infección
IgA	200 (13)	Protege la mucosa
IgM	150 (9)	IG principal para las respuestas inmunitarias primarias
IgD	2 (<1)	Regula las células B
IgE	<1 (traza)	IG principal en respuestas alérgicas

1. Preparación y purificación

Las preparaciones de inmunoglobulina proporcionadas en el presente documento pueden prepararse a partir de cualquier material de partida adecuado. Por ejemplo, pueden aislarse inmunoglobulinas de sangre humana o animal, por ejemplo, de suero de donantes humanos, o producirse por otros medios, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante o tecnología de hibridoma. Por tanto, las preparaciones de inmunoglobulina pueden incluir inmunoglobulinas monoclonales o recombinantes. Por ejemplo, pueden obtenerse inmunoglobulinas de tejidos, cultivos de hibridoma de linfocitos, suero o plasma sanguíneo, o cultivos celulares recombinantes usando cualquier procedimiento adecuado, tal como, por ejemplo, precipitación (fraccionamiento con alcohol de Cohn o fraccionamiento con polietilenglicol); métodos cromatográficos (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad); ultracentrifugación; o preparación electroforética (véanse, por ejemplo, Cohn *et al.* (1946) *J. Am. Chem. Soc.* 68: 459-75; Oncley *et al.* (1949) *J. Am. Chem. Soc.*, 71: 541-50; Barandem *et al.* (1962) *Vox Sang.*, 7: 157-74; Koblet *et al.* (1967) *Vox Sang.*, 13: 93-102; las patentes estadounidenses n.ºs 5.122.373 y 5.177.194). Normalmente, se prepara una inmunoglobulina a partir de productos que contienen gammaglobulina producidos mediante métodos de fraccionamiento con alcohol y/o cromatografía de intercambio iónico y afinidad bien conocidos por los expertos en la técnica.

Pueden usarse etapas preparativas para enriquecer un isotipo o subtipo particular de inmunoglobulina. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de proteína A, proteína G o proteína H Sepharose para enriquecer una mezcla de inmunoglobulinas en IgG, o en subtipos de IgG específicos. (Véanse en general Harlow y Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); patente estadounidense n.º 5.180.810).

a. Método de Cohn-Oncley

Los métodos industriales convencionales de purificación de inmunoglobulinas a partir de plasma sanguíneo se basan en fraccionamiento con etanol frío, que coprecipita grupos de proteínas basándose en sus puntos isoeléctricos a concentraciones de alcohol dadas a temperaturas por debajo de cero, empleados originalmente por Cohn y modificados por Oncley (véanse, por ejemplo, Cohn *et al.* (1946) *J. Am. Chem. Soc.* 68: 459-75; Oncley *et al.* (1949) *J. Am. Chem. Soc.* 71: 541-50). El uso de alcohol en el procedimiento de purificación puede inactivar potencialmente virus contaminantes, sin embargo, con el aumento de la temperatura y la concentración de alcohol, el método de Cohn-Oncley puede dar como resultado proteínas desnaturalizadas y agregadas. Estas formas de peso molecular alto pueden actuar como complejos anticuerpo-antígeno que tienen la capacidad de fijar libremente el complemento.

b. Procedimientos de Cohn-Oncley modificados

Para evitar los efectos no deseados del método de Cohn-Oncley, se han desarrollado métodos de Cohn-Oncley modificados para la preparación y purificación de IG. Se conocen diversos procedimientos de este tipo y pueden adaptarse y modificarse para producir las preparaciones de IG en el presente documento. Está dentro del conocimiento de la técnica preparar preparaciones de IG en vista de los métodos detallados conocidos y disponibles en la técnica.

Normalmente, se fabrica IG usando un fraccionamiento primario en etanol frío y un fraccionamiento secundario que puede incluir, por ejemplo, una cualquiera o más de las siguientes etapas para obtener un producto que tiene una baja actividad anti-complementaria (ACA): separación de agregados de IG mediante técnicas convencionales, tales

como ultracentrifugación o cromatografía de exclusión; modificación química de las moléculas de IG mediante alcoholización, alquilación, sulfonación y tratamiento con agentes reductores (véase por ejemplo, la patente estadounidense 6.875.848); incubación a un pH moderadamente ácido (pH 4,0) con o sin pepsina, plasmina y tripsina inmovilizada; fraccionamiento de plasma humano por medio de polímeros de etilenglicol (Polson *et al.* (1964) Biochim. Biophys. Acta. 82: 463-475), incorporación de polietilenglicol (PEG) como agente de purificación para material separado del fraccionamiento de Cohn (fracción II o II + III, véanse por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.093.606 y 4.165.370), métodos de fraccionamiento que usan polietilenglicol como agente de precipitación, y otras técnicas descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 4.093.606, 4.126.605, 3.966.906 y 4.124.576, y otros métodos similares de procedimientos de purificación con polietilenglicol (documento EP 0246579); tratamiento con B-propiolactona; cromatografía de intercambio iónico para eliminar contaminantes no deseados de los materiales de partida usados para obtener las preparaciones de IG (véanse por ejemplo, la patente estadounidense n.º 3.869.436, documentos EP 91300790 y WO 94/29334). El documento EP 0440483 describe una combinación de técnicas útiles para facilitar la preparación intravenosa del producto basándose en cromatografía de intercambio iónico y diafiltración a un pH débilmente ácido; escisión enzimática; tratamiento con disolvente/detergente; y diafiltración y ultrafiltración. También se describen en la técnica otros métodos y los conoce un experto en la técnica (véanse por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.177.194 y 6.875.848).

Se usa comúnmente la fracción II de Cohn purificada. La pasta de fracción II de Cohn de partida normalmente tiene aproximadamente el 95 por ciento de IgG y también contiene los cuatro subtipos de IG. Los diferentes subtipos están presentes en la fracción II en aproximadamente la misma razón en la que se encuentran en el plasma humano reunido del que se obtienen. La fracción II se purifica adicionalmente antes de la formulación para dar un producto administrable. Por ejemplo, la fracción II puede disolverse en disolución de alcohol acuosa purificada fría y eliminarse las impurezas por medio de precipitación y filtración. Tras la filtración final, la suspensión de inmunoglobulina puede dializarse o diafiltrarse (por ejemplo usando membranas de ultrafiltración que tienen un límite de peso molecular nominal de menos de o igual a 100.000 daltons) para eliminar el alcohol. La disolución puede concentrarse o diluirse para obtener la concentración de proteína deseada y puede purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

c. Procesamiento viral

Las preparaciones de IG deben tratarse para eliminar la carga viral. Hay dos métodos de procesamiento viral: inactivación viral y reparto o eliminación viral. La inactivación viral hace que los virus sean inactivos, por ejemplo, alterando químicamente el recubrimiento de lípido o proteína, o desnaturalizando completamente el virus. A modo de ejemplo de métodos de inactivación viral se incluyen, pero sin limitarse a, calentamiento (pasteurización), tratamiento con disolvente/detergente (S/D) y exposición a un entorno ácido (bajo pH). El procedimiento de S/D es el método de inactivación viral más ampliamente usado en la industria del plasma sanguíneo, usado para inactivar virus que contienen un recubrimiento lipídico. Por ejemplo, se ha demostrado que el procedimiento de S/D tiene acción viricida contra VSV (virus de la estomatitis vesicular), virus Sindbis, VIH, VHB (virus de la hepatitis B) y VHC (virus de la hepatitis C).

La eliminación viral es un método que elimina completamente todos los virus de la muestra. A modo de ejemplo del reparto o eliminación viral se incluyen, pero sin limitarse a, fraccionamiento con etanol frío, reparto en fases o precipitación con PEG, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico o exclusión en gel y nanofiltración.

d. Concentración de proteína

Pueden prepararse inmunoglobulinas a concentraciones variables. Por ejemplo, puede prepararse IG a concentraciones de proteína que oscilan entre el o aproximadamente el 3-25% de IG, normalmente entre el o aproximadamente el 10% y el 22%, tal como el 10% - 20% p/v. Por ejemplo, las preparaciones de IG pueden estar a o de aproximadamente el 18% al 22% de IG p/v. Las preparaciones de IG proporcionadas en el presente documento generalmente se preparan a concentraciones de IG de a o aproximadamente el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 21%, el 22% o más. La concentración de proteína final depende en gran medida del método de generación y purificación. Se contempla en el presente documento que pueda usarse cualquier preparación de inmunoglobulina en el presente documento para coformulaciones estables con hialuronidasa. Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar empíricamente la concentración apropiada de IG para su inclusión en las coformulaciones estables en el presente documento. La elección de la preparación de IG dependerá de una variedad de factores tales como la vía de administración, el paciente que va a tratarse y el tipo de estado que va a tratarse.

Por ejemplo, puede usarse cualquier preparación de IG conocida o existente. Éstas incluyen preparaciones de IG normalmente usadas para administración i.v. (IGIV). En general, las preparaciones de IG finales para administración intravenosa tienen una concentración de proteína de aproximadamente el 3 al 12% p/v, o normalmente el 10% p/v. Por ejemplo, IGIV está disponible comercialmente como Carimune[®] NF, Flebogamma[®] 5%, Gammagard[®] Liquid, Gammagard[®] S/D, Gamunex[®], Iveegam[®] EN, Octagam[®] y Poligam[®] S/D. Normalmente, tales preparaciones usan un método de fraccionamiento con alcohol frío, pero difieren en los métodos usados para aislar y purificar la

inmunoglobulina y los métodos para reducir la posible contaminación por virus.

Además, pueden usarse otras preparaciones formuladas actualmente para administración subcutánea o intramuscular en las composiciones y los métodos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, preparaciones de IG para administración intramuscular y administración subcutánea están disponibles comercialmente como GamaSTAN[®] S/D y Vivaglobin[®], respectivamente. Normalmente, tales preparaciones usan fraccionamiento con etanol frío de plasma humano y tienen una concentración de IgG de aproximadamente el 15 al 18% o del 10 al 22%, respectivamente. La solicitud estadounidense provisional n.º 61/181.606 describe la generación de una composición de inmunoglobulina altamente purificada y concentrada a partir de plasma reunido para administración subcutánea.

e. Preparaciones de IG a modo de ejemplo

i. 10% de IG

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

ii. Preparaciones de IG de alta concentración (por ejemplo el 20% de IG)

La generación de preparaciones de inmunoglobulina de alta concentración se describe en la solicitud estadounidense provisional n.º 61/181.606. A modo de ejemplo de preparaciones que contienen el 18-22% de IG son formulaciones de inmunoglobulina líquidas altamente purificadas, isotónicas (al menos el 95% de IgG) formuladas en glicina 0,25 mM a pH de 4,4 a 4,9, representadas en los ejemplos más adelante.

Los productos de IgG de alta concentración descritos en el presente documento se producen mediante un procedimiento que tiene muchas de las mismas etapas o similares que el procedimiento de producción de preparaciones de IGIV tradicionales (por ejemplo el 10% de IG). Las etapas adicionales, ultrafiltración/diafiltración usando membranas de canales abiertos con un lavado posterior diseñado específicamente y formulación casi al final del procedimiento de producción, hacen que las composiciones de IG resultantes tengan una concentración aproximadamente dos veces más alta (200 mg/ml) en comparación con las IGIV del estado de la técnica (por ejemplo, Gammagard Liquid), sin afectar al rendimiento y la estabilidad en almacenamiento. Con la mayoría de las membranas de ultrafiltración disponibles comercialmente, no puede alcanzarse una concentración de IgG de 200 mg/ml sin pérdidas de proteína importantes. Estas membranas se bloquean pronto, en consecuencia el lavado posterior es difícil de lograr. Por tanto, tienen que usarse configuraciones de membrana de canales abiertos. Además, se emplea un procedimiento de lavado posterior específicamente diseñado para obtener la concentración de IG requerida sin pérdida de proteína significativa (pérdida de menos del 2%); la concentración de proteína superior de 200 mg/ml no afecta a la capacidad de inactivación de virus de la etapa de almacenamiento a bajo pH.

El procedimiento general de producción de la composición de IG de alta concentración incluye las siguientes etapas que se describen en detalle adicional en el ejemplo 2. En primer lugar, los crioprecipitados se separan del plasma previamente congelado para producir un "plasma crioempobrecido" líquido, que se procesa en la siguiente etapa para obtener el sobrenadante (o fraccionamiento I). El ajuste del pH y la concentración de etanol, normalmente a 7 y del 20 al 25% v/v, respectivamente, seguido por centrifugación posterior mientras se disminuye la temperatura, separa el líquido y el sólido. El precipitado de esta etapa se extrae entonces, se mezcla con sílice pirogénica, y se filtra, realizándose todas las etapas a bajas temperaturas, normalmente de 2 a 8°C. Entonces se mezcla el filtrado con polisorbato 80 y citrato de sodio deshidratado mientras se agita a de 2 a 8°C. Se obtiene entonces el precipitado G, de una manera similar a la etapa de precipitación de Cohn II, en la que se ajustan el pH y la concentración de alcohol. El precipitado G se disuelve y se filtra con un filtro de profundidad de un tamaño de poro nominal de 0,2 µm (por ejemplo, filtro Cuno VR06 o equivalente) para obtener un filtrado transparente. Tratamiento con disolvente/detergente posterior, normalmente usando Triton X-100 al 1,0% (v/v), Tween-80 al 0,3% (v/v) y TNBP al 0,3% (v/v), a de 18 a 25°C durante al menos 60 minutos, seguido por cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y nanofiltración usando, por ejemplo, un filtro Asahi Planova 35N o equivalente. Posterior a la nanofiltración, se concentra el filtrado hasta una concentración de proteína del 5 ± 1% p/v mediante ultrafiltración. En algunos ejemplos, la ultrafiltración se lleva a cabo en un casete con un tamiz de canales

abiertos y la membrana de ultrafiltración tiene un punto de corte de peso molecular nominal (NMWCO) de 50 kDa o menos. Tras la finalización de la etapa de ultrafiltración, el concentrado se somete a diafiltración frente a disolución de glicina 0,25 M con un pH bajo. Normalmente, el volumen de intercambio mínimo es 6 veces el volumen de concentrado original, y la disolución se concentra hasta una concentración de proteína de más del 20% p/v. Al final del procedimiento de diafiltración y concentración, el pH de la disolución es normalmente de entre 4,4 y 4,9. Para la formulación, la concentración de proteína de la disolución se ajusta entonces a justo por encima del 20% p/v, por ejemplo, el $20,4 \pm 0,4\%$ p/v, con el tampón de diafiltración. La disolución a granel formulada se esteriliza adicionalmente filtrando en primer lugar a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro absoluto de 0,2 micrómetros o menos. Entonces se dispersa la disolución de manera aséptica en los recipientes finales para un sellado apropiado, tomándose muestras para pruebas. La etapa final es el almacenamiento de los recipientes sellados a de 30 a 32°C durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, de 21 a 22 días.

La incorporación de etapas de ultrafiltración y formulaciones en el procedimiento de fabricación es una mejora con respecto a los métodos de purificación y concentración de IG anteriormente usados, dando como resultado preparaciones con concentraciones de IG superiores sin pérdidas significativas de actividad de IG al tiempo que se mantiene un bajo pH en la formulación final. Normalmente, los productos tienen una concentración de proteína de al menos el 18% peso/volumen (p/v), de la cual la gran mayoría (normalmente no menos del 95%) es IgG, y un pH en el intervalo de pH 3-6, que facilita la inactivación de patógenos tales como virus que pueden estar presentes en el plasma. Debido a la alta concentración de IG y por tanto volumen reducido en la administración, las preparaciones de alta concentración son adecuadas para la administración subcutánea. En algunas realizaciones, los productos de IG tienen una viscosidad no mayor de 18 mPascales·segundo y por tanto pueden ser adecuados para administración intravenosa también. Una simple dilución puede permitir también la administración intravenosa.

2. Estabilidad en almacenamiento

Las formulaciones de IG purificadas, finales deben prepararse para que conserven la actividad de la IG y evitar una agregación excesiva. Tras el almacenamiento de las preparaciones de IG, la agregación puede minimizarse y mejorarse la estabilidad, por ejemplo, mediante la adición de excipientes estabilizantes de proteínas o ajustando el pH de la disolución.

a. Excipientes estabilizantes de proteínas

Un modo de aumentar la estabilidad de preparaciones de IG que se conoce bien en la técnica es añadir excipientes estabilizantes de proteínas a la preparación de IG. Los excipientes conocidos incluyen, pero no se limitan a, azúcares, polioles, aminoácidos, aminos, sales, polímeros y tensioactivos. Por ejemplo, la patente estadounidense 4.499.073 describe la estabilización como resultado de la fuerza iónica y el pH de la disolución en almacenamiento; la patente japonesa 54020124 da a conocer la adición de un aminoácido a una preparación intramuscular para hacer que la preparación sea estable y segura para el almacenamiento; los documentos JP 57031623 y JP 57128635 divulgan el uso de arginina y/o lisina con NaCl en preparaciones del 5 al 15% de IG para lograr estabilidad a largo plazo en una preparación intramuscular; el documento JP 4346934 da a conocer el uso de baja conductividad (menos de 1 mmho), pH de 5,3 a 5,7 y opcionalmente uno o más estabilizadores, incluyendo PEG, albúmina sérica humana y manitol; el documento US 4.439.421 enseña la adición de una macromolécula hidrófila, un poliol y otra proteína para estabilizar frente a la generación de anticomplemento; el documento US 5.945.098 da a conocer la estabilización de disoluciones isotónicas mediante la adición de aminoácidos (glicina de 0,1 a 0,3 M) y detergentes no iónicos (polisorbato y PEG); el documento US 4.186.192 da a conocer diversos aditivos, incluyendo aminoácidos; el documento WO 2005/049078 da a conocer la estabilización con maltosa, y adicionalmente, glicina hasta 0,1 M; el documento US 4.362.661 da a conocer el uso de aminoácidos neutros y básicos para conferir estabilidad en una preparación del 5% de IG. También pueden prepararse formulaciones líquidas estables usando hidratos de carbono en un medio acuoso con fuerza iónica muy baja y un pH de 4,25 (patente estadounidense n.º 4.396.608) o un pH débilmente ácido de 5-6 (documento EP 0278422).

También puede controlarse la formación de dímeros de preparaciones de IG. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.871.736 da a conocer preparaciones de IG, particularmente preparaciones líquidas, que contienen uno o más estabilizadores anfífilos frente a la formación de dímeros. Los estabilizadores anfífilos incluyen ácido nicotínico y sus derivados, en particular nicotinamida, y principalmente en conjunto con aminoácidos que tienen cadenas laterales lipófilas no cargadas, por ejemplo, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina, prolina y valina.

b. pH

Las preparaciones de IG pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como cualquiera descrito en el presente documento. Generalmente, sin embargo, el pH de la preparación final se ajusta a un pH relativamente alto, concretamente en el intervalo de aproximadamente pH 4,0 a 7,4. Se ha encontrado que el pH de la preparación de inmunoglobulina es un factor importante en relación con el contenido en monómero de IgG del producto final. Generalmente, una preparación del 5 por ciento de inmunoglobulina tiene un pH de $4,2 \pm 0,5$. Preparaciones del diez por ciento son lo más estables a un pH de $5,2 \pm 0,2$. El pH óptimo se obtiene mediante

técnicas de formulación bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el pH óptimo puede determinarse a partir de determinaciones de cromatografía de exclusión molecular así como datos de estabilidad térmica y títulos anticomplemento de las diversas preparaciones en condiciones de pH diferentes.

5 D. Hialuronidasa

Se proporcionan en el presente documento coformulaciones estables que contienen inmunoglobulina y una hialuronidasa, normalmente una hialuronidasa soluble. Las hialuronidasas son miembros de una gran familia de enzimas que degradan ácido hialurónico, que es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Catalizando la hidrólisis de ácido hialurónico, un constituyente principal de la barrera intersticial, la hialuronidasa disminuye la viscosidad del ácido hialurónico, aumentando de ese modo la permeabilidad tisular. Como tales, se han usado hialuronidasas, por ejemplo, como agente de extensión o dispersión conjuntamente con otros agentes, fármacos y proteínas para potenciar su dispersión y administración. A modo de ejemplo de hialuronidasas en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento son hialuronidasas solubles.

Hay tres clases generales de hialuronidasas; hialuronidasa de mamífero, hialuronidasa bacteriana y hialuronidasa de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos.

Las hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35) son endo- β -N-acetil-hexosaminidasas que hidrolizan el enlace glicosídico $\beta 1 \rightarrow 4$ del hialuronano para dar diversas longitudes de oligosacárido tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Tienen actividades tanto hidrolítica como transglicosidasa, y pueden degradar hialuronano y sulfatos de condroitina (CS), generalmente C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas de vacas (bovinas) (SEQ ID NO: 10 y 11), ratón (SEQ ID NO: 17-19, 32), cerdo (SEQ ID NO: 20-21), rata (SEQ ID NO: 22-24, 31), conejo (SEQ ID NO: 25), oveja (ovinas) (SEQ ID NO: 26 y 27), orangután (SEQ ID NO: 28), mono cynomolgus (SEQ ID NO: 29), cobaya (SEQ ID NO: 30), y hialuronidasas humanas.

Las hialuronidasas de mamífero pueden subdividirse adicionalmente en las que son activas neutras, predominantemente encontradas en extractos de testículos, y activas ácidas, predominantemente encontradas en órganos tales como el hígado. Las hialuronidasas activas neutras a modo de ejemplo incluyen PH20, incluyendo pero sin limitarse a, PH20 derivada de diferentes especies tales como ovina (SEQ ID NO: 27), bovina (SEQ ID NO: 11) y humana (SEQ ID NO: 1). PH20 humana (también conocida como SPAM1 o proteína de superficie de espermatozoide PH20), está unida generalmente a la membrana plasmática por medio de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Está implicada de manera natural en la adhesión espermatozoide-óvulo y ayuda en la penetración del espermatozoide en la capa de células del cúmulo digiriendo ácido hialurónico.

Además de PH20 humana (también denominada SPAM1), se han identificado cinco genes de tipo hialuronidasa en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y HYALP1. HYALP1 es un pseudogen, y no se ha mostrado que HYAL3 (SEQ ID NO: 38) presente actividad enzimática hacia ningún sustrato conocido. HYAL4 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 39) es una condroitinasa y presenta poca actividad hacia hialuronano. HYAL1 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 36) es la enzima activa ácida prototípica y PH20 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 1) es la enzima activa neutra prototípica. Las hialuronidasas activas ácidas, tales como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 37) carecen generalmente de actividad catalítica a pH neutro (es decir pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* por encima de pH 4,5 (Frost *et al.* (1997) Anal. Biochemistry, 251: 263-269). HYAL2 es una enzima activa ácida con una actividad específica muy baja *in vitro*. Las enzimas de tipo hialuronidasa también pueden caracterizarse por las que se unen generalmente a la membrana plasmática por medio de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol tal como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilovitch-Miagkova *et al.* (2003) Proc Natl Acad Sci USA. 100(8): 4580-5), y las que son generalmente solubles tales como HYAL1 humana (Frost *et al.*, (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1): 10-5).

1. PH20

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

Las proteínas PH20 a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de PH20 humana (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 1, polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 2), bovina (SEQ ID NO: 11), de

conejo (SEQ ID NO: 25), PH20 ovina (SEQ ID NO: 27), de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 29), de cobaya (SEQ ID NO: 30), de rata (SEQ ID NO: 31) y de ratón (SEQ ID NO: 32).

La PH20 bovina es un polipéptido precursor de 553 aminoácidos (SEQ ID NO: 11). La alineación de PH20 bovina con la PH20 humana muestra sólo una homología débil, existiendo múltiples huecos desde el aminoácido 470 hasta el extremo carboxilo-terminal respectivo debido a la ausencia de un anclaje de GPI en el polipéptido bovino (véase por ejemplo, Frost GI (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4: 427-440). De hecho, no se predicen anclajes de GPI claros en muchas otras especies de PH20 además de humanos. Por tanto, los polipéptidos de PH20 producidos a partir de ovinos y bovinos existen de manera natural como formas solubles. Aunque PH20 bovina existe unida de manera muy suelta a la membrana plasmática, no está anclada por medio de un anclaje sensible a fosfolipasa (Lalancette *et al.* (2001) Biol Reprod. 65(2): 628-36). Esta característica única de hialuronidasa bovina ha permitido el uso de enzima hialuronidasa de testículos bovinos soluble como extracto para uso clínico (Wydase[®], Hyalase[®]).

El transcrito de ARNm de PH20 humana se traduce normalmente para generar un polipéptido precursor de 509 aminoácidos (SEQ ID NO: 1) que contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en el extremo N-terminal (posiciones de residuo de aminoácido 1-35) y una secuencia señal de unión a anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) de 19 aminoácidos en el extremo C-terminal (posiciones de residuo de aminoácido 491-509). La PH20 madura es, por tanto, un polipéptido de 474 aminoácidos expuesto en SEQ ID NO: 2. Tras el transporte del polipéptido precursor al ER y la eliminación del péptido señal, se escinde el péptido señal de unión a GPI C-terminal para facilitar la unión covalente de un anclaje de GPI al aminoácido C-terminal recién formado en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 490 del polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 1. Por tanto, se produce un polipéptido maduro con anclaje de GPI de 474 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

En comparación con otras hialuronidasas, incluyendo hialuronidasa de veneno de abejas y miel y PH20 de ratón, mono y cobaya, PH20 humana contiene una región común de 340 aminoácidos con 57 aminoácidos conservados (véase por ejemplo Arming *et al.* (1997) Eur. J. Biochem., 247: 810-814). Los aminoácidos conservados incluyen cuatro residuos de cisteína que forman puentes disulfuro en los residuos de aminoácido 25, 189, 203 y 316 en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 (correspondientes a los residuos 60, 224, 238 y 351 en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1). Se forman enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 para formar el dominio de hialuronidasa central. Sin embargo, se requieren cisteínas adicionales en el extremo carboxilo-terminal para la actividad catalítica de la enzima neutra de manera que los aminoácidos 36 a 464 de SEQ ID NO: 1 contengan el dominio de hialuronidasa PH20 humana mínimamente activo. Se forman cuatro enlaces disulfuro adicionales entre los residuos de cisteína C376 y C387; entre C381 y C435; entre C437 y C443; y entre C458 y C464 del polipéptido ejemplificado en SEQ ID NO: 1 (correspondientes a los residuos C341 y C352; entre C346 y C400; entre C402 y C408; y entre C423 y C429 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 2, respectivamente).

Además, otros residuos conservados están implicados probablemente en la unión al sustrato y la catálisis. Los residuos de aminoácido en las posiciones de aminoácido 111, 113, 176, 249 y 252 correspondientes a los residuos en SEQ ID NO: 2 parecen estar implicados en la actividad de PH20, puesto que la mutación en esta posición hace que la enzima carezca de actividad enzimática o deja una actividad sólo residual en comparación con PH20 de tipo natural que no contiene las mutaciones (véase por ejemplo Arming *et al.* (1997) Eur. J. Biochem., 247: 810-814).

Hay siete posibles sitios de glicosilación con unión a N en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humana ejemplificada en SEQ ID NO: 1. Se forman enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 para formar el dominio de hialuronidasa central. Puesto que los aminoácidos 36 a 464 de SEQ ID NO: 1 contienen el dominio de hialuronidasa PH20 humana mínimamente activo, no se requiere sitio de glicosilación con unión a N N-490 para lograr una actividad hialuronidasa apropiada.

2. Hialuronidasa soluble

Generalmente, la hialuronidasa en las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento son hialuronidasas solubles. Las hialuronidasas solubles, cuando se expresan en células, se secretan al medio. La solubilidad puede demostrarse mediante reparto de la proteína en la fase acuosa de una disolución de Triton X-114. Por consiguiente, se entiende que una hialuronidasa soluble no incluye ninguna hialuronidasa que contenga un anclaje de GPI, que hace que el polipéptido se una a la membrana celular. Por ejemplo, PH20 humana de longitud completa (expuesta en su forma madura como SEQ ID NO: 2) contiene un anclaje de GPI y no es soluble. En cambio, polipéptidos de PH20 ovina y bovina no contienen un anclaje de GPI que sea suficiente para la unión al anclaje de GPI, y por tanto se considera que son proteínas solubles. Además, las hialuronidasas solubles que se incluyen en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento generalmente son proteínas sustancialmente purificadas. Además, las hialuronidasas solubles conservan la actividad hialuronidasa. Por ejemplo, PH20 humana soluble conserva la actividad neutra.

Las hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas que no incluyen de manera natural un anclaje de GPI o un anclaje suficiente para la unión a la membrana, incluyendo, pero sin limitarse a, Hyal1, PH20 bovina y PH20 ovina,

variantes alélicas de las mismas y otras variantes. También se incluyen entre la hialuronidasa soluble cualquier hialuronidasa que se haya modificado para que sea soluble. Por ejemplo, PH20 humana, que normalmente está anclada a la membrana por medio de un anclaje de GPI, puede hacerse soluble mediante truncamiento de y eliminación de todo o una parte del anclaje de GPI en el extremo C-terminal. Las hialuronidasas solubles también incluyen hialuronidasas activas neutras y activas ácidas, sin embargo, se contemplan hialuronidasas activas neutras para su uso en el presente documento para fines de administración subcutánea.

Por tanto, a modo de ejemplo de una hialuronidasa soluble es PH20 de cualquier especie, tal como cualquiera expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 30, 31 y 32, o formas truncadas de las mismas que carecen de todo o una parte del anclaje de GPI C-terminal, siempre que la hialuronidasa sea soluble y conserve la actividad hialuronidasa. También se incluyen entre las hialuronidasas solubles variantes alélicas u otras variantes de formas solubles de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 30, 31 y 32, tales como formas truncadas de las mismas. Un experto en la técnica conoce variantes alélicas y otras variantes, e incluyen polipéptidos que tienen una identidad de secuencia del 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95% o más con cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 30 y 31, o formas truncadas de las mismas.

Normalmente, las coformulaciones en el presente documento contienen una PH20 humana soluble. Aunque pueden utilizarse PH20 de otros animales, tales preparaciones son potencialmente inmunogénicas, puesto que son proteínas animales. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demuestran sensibilización previa secundaria a alimentos ingeridos, y puesto que éstas son proteínas animales, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización posterior. Por tanto, preparaciones no humanas pueden no ser adecuadas para uso crónico. Si se desean preparaciones no humanas, se contempla en el presente documento que tales polipéptidos pueden prepararse para que tengan inmunogenicidad reducida. Tales modificaciones están dentro del nivel de un experto en la técnica.

a. PH20 humana soluble

A modo de ejemplo de una hialuronidasa soluble es PH20 humana soluble. Se han producido formas solubles de PH20 humana recombinante y pueden incluirse en las coformulaciones descritas en el presente documento. La producción de tales formas solubles de PH20 se describe en las solicitudes de patente estadounidense n.ºs 2005-0260186 y 2006-0104968. Las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera que tenga truncamientos C-terminales para generar polipéptidos que contienen del aminoácido 1 al aminoácido 464 o de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO 1. Por ejemplo, las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera que tenga truncamientos C-terminales para generar polipéptidos que contienen del aminoácido 1 al aminoácido 467 a 483, por ejemplo, 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483. Cuando se expresan en células de mamífero, la secuencia señal N-terminal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína se secreta. Por tanto, los polipéptidos solubles maduros contienen al menos los aminoácidos 36 a 464 de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, los polipéptidos solubles maduros contienen los aminoácidos 36 a 467 a 36 a 483 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo 36 a 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de SEQ ID NO: 1. Los mutantes de delección que terminan en la posición de aminoácido 477 a 483 (correspondientes al polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO: 1) presentan actividad hialuronidasa secretada superior que la forma con anclaje de GPI de longitud o completa. Por tanto, a modo de ejemplo de hialuronidasas solubles son las que tienen 442, 443, 444, 445, 446 ó 447 aminoácidos de longitud, tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 4-9, o variantes alélicas o de especie u otras variantes de las mismas.

b. PH20 humana soluble recombinante (rHuPH20)

Se han generado formas solubles recombinantes de PH20 humana designadas como rHuPH20 y pueden producirse y purificarse usando los métodos descritos en el presente documento. La generación de tales formas solubles de rHuPH20 se describen en las solicitudes de patente estadounidense con n.º de serie 11/065.716 y 11/238.171 (publicadas como solicitudes de patente estadounidense publicada n.ºs US20050260186 y US 20060104968), y en los ejemplos 3 más adelante. A modo de ejemplo de tales polipéptidos son los generados a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica para los aminoácidos 1-482 expuestos en SEQ ID NO: 3. El procesamiento postraducciona elimina la secuencia señal de 35 aminoácidos, dando como resultado la secreción de una rHuPH20 soluble de 447 aminoácidos (SEQ ID NO: 4). La rHuPH20 purificada resultante puede ser heterogénea debido a peptidasas presentes en el medio de cultivo tras la producción y purificación. Normalmente, rHuPH20 se produce en células que facilitan la N-glicosilación correcta para conservar la actividad, tales como células CHO (por ejemplo células DG44 CHO).

3. Glicosilación

La glicosilación, incluyendo glicosilación con unión a N y O, de algunas hialuronidasas puede ser muy importante para su actividad catalítica y estabilidad. Aunque alterar el tipo de glicano que modifica una glicoproteína puede tener efectos drásticos sobre la antigenicidad, plegamiento estructural, solubilidad y estabilidad de una proteína, no se cree que la mayoría de las enzimas requieran glicosilación para lograr una actividad enzimática óptima. Tales hialuronidasas son únicas en este sentido, ya que la eliminación de la glicosilación con unión a N puede dar como

resultado una inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. Para tales hialuronidasas, la presencia de glicanos con unión a N es crítica para la generación de una enzima activa.

Los oligosacáridos con unión a N pertenecen a varios tipos principales (de oligomanosa, complejos, híbridos, sulfatados), todos los cuales tienen núcleos de (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc unidos por medio del nitrógeno de amida de residuos de Asn que se encuentran dentro de secuencias de Asn-Xaa-Thr/Ser (donde Xaa no es Pro). Se ha notificado la glicosilación en un sitio Asn-Xaa-Cys para la proteína de coagulación C. En algunos casos, la hialuronidasa puede contener enlaces tanto N-glicosídicos como O-glicosídicos. Por ejemplo, PH20 tiene oligosacáridos con unión a O así como oligosacáridos con unión a N. Hay siete posibles sitios de glicosilación con unión a N en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humana ejemplificada en SEQ ID NO: 1. Tal como se indicó anteriormente, no se requiere la glicosilación con unión a N en N490 para la actividad hialuronidasa.

4. Modificaciones de hialuronidasas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas

Las hialuronidasas proporcionadas en las coformulaciones pueden modificarse para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, tal como aumentar su semivida *in vivo* y/o actividades. La modificación de hialuronidasas para su uso en coformulaciones proporcionadas en el presente documento puede incluir unir, directa o indirectamente por medio de un ligador, tal como covalentemente o mediante otro enlace estable, un polímero, tal como dextrano, un polietilenglicol (pegilación (PEG)) o resto sialilo, u otro de tales polímeros, tales como polímeros naturales o de azúcar.

Se sabe que la pegilación de productos terapéuticos aumenta la resistencia a la proteólisis, aumenta la semivida plasmática y disminuye la antigenicidad e inmunogenicidad. La unión covalente u otra unión estable (conjugación) de moléculas poliméricas, tales como resto polietilenglicol (PEG), a la hialuronidasa puede conferir por tanto propiedades beneficiosas a la composición de enzima-polímero resultante. Tales propiedades incluyen biocompatibilidad mejorada, extensión de la semivida de la proteína (y actividad enzimática) en la sangre, células y/o en otros tejidos dentro de un sujeto, protección eficaz de la proteína frente a proteasas e hidrólisis, biodistribución mejorada, farmacocinética y/o farmacodinámica potenciadas, y solubilidad en agua aumentada.

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

Normalmente, los polímeros son poli(óxidos de alquileo) (PAO), tales como poli(óxidos de etileno), tales como PEG, normalmente mPEG, que, en comparación con polisacáridos tales como dextrano, pululano y similares, tienen pocos grupos reactivos que puedan reticularse. Normalmente, los polímeros son moléculas poliméricas no tóxicas tales como (m)polietilenglicol (mPEG) que pueden conjugarse covalentemente con la enzima que degrada hialuronano (por ejemplo, con grupos de unión en la superficie de la proteína) usando una química relativamente sencilla.

Las moléculas poliméricas adecuadas para la unión a la enzima que degrada hialuronano incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG tales como metoxipolietilenglicoles (mPEG), PEG-glicidil éteres (Epox-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), PEG ramificados y poli(óxido de etileno) (PEO) (véanse por ejemplo Roberts *et al.*, *Advanced Drug Delivery Review* 2002, 54: 459-476; Harris y Zalipsky (eds.) "Poly(ethylen glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar *et al.*, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1):125-136, 2000; Harris, *Nature Reviews* 2:215 et seq. (2003); y Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37):38118-24, 2004). La molécula polimérica puede ser de un peso molecular que oscila normalmente entre aproximadamente 3 kDa y aproximadamente 60 kDa. En algunas realizaciones la molécula polimérica que se conjuga con una proteína, tal como rHuPH20, tiene un peso molecular de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más de 60 kDa.

Se conocen en la técnica diversos métodos de modificación de polipéptidos uniendo covalentemente (conjugando) un PEG o derivado de PEG (es decir "pegilación") (véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 2006/0104968; U.S. 5.672.662; U.S. 6.737.505; y U.S. 2004/0235734). Las técnicas para la pegilación incluyen, pero no se limitan a, ligadores especializados y químicas de acoplamiento (véase, por ejemplo, Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476, 2002), unión de múltiples restos de PEG a un único sitio de conjugación (tal como mediante el uso de PEG

ramificados; véase, por ejemplo, Veronese *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), monopegilación y/o pegilación específica de sitio (véase, por ejemplo, Chapman *et al.*, *Nature Biotech.* 17:780-783, 1999), y pegilación enzimática dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002) (véanse también, por ejemplo, Lu y Felix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:127-138; Lu y Felix (1993) *Peptide Res.* 6:142-6, 1993; Felix *et al.* (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46:253-64; Benhar *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13398-404; Brumeau *et al.* (1995) *J. Immunol.* 154:3088-95; véanse también, Caliceti *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). Los métodos y las técnicas descritos en la técnica pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 PEG o derivados de PEG unidos a una única molécula de proteína (véase, por ejemplo, el documento U.S. 2006/0104968).

Se han descrito en la técnica numerosos reactivos para la pegilación. Tales reactivos incluyen, pero no se limitan a, PEG activado con N-hidroxisuccinimidilo (NHS), succinimidil-mPEG, mPEG2-N-hidroxisuccinimida, alfa-metilbutanoato de mPEG-succinimidilo, propionato de mPEG-succinimidilo, butanoato de mPEG-succinimidilo, éster succinimidílico del ácido mPEG-carboximetil-3-hidroxibutanoico, propionato de PEG-succinimidilo homobifuncional, PEG-propionaldehído homobifuncional, PEG-butilaldehído homobifuncional, PEG-maleimida, PEG-hidrazida, p-nitrofenil-carbonato-PEG, carbonato de mPEG-benzotriazol, propionaldehído-PEG, mPEG-butilaldehído, mPEG2-butilaldehído ramificado, mPEG-acetilo, mPEG-piperidona, mPEG-metilcetona, mPEG-maleimida "sin ligador", mPEG-vinilsulfona, mPEG-tiol, mPEG-ortopiridilidíoléster, mPEG-ortopiridildisulfuro, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona-PEG-NHS, acrilato-PEG-NHS, fluoresceína-PEG-NHS y biotina-PEG-NHS (véanse, por ejemplo, Monfardini *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 6:62-69, 1995; Veronese *et al.*, *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; los documentos U.S. 5.672.662; U.S. 5.932.462; U.S. 6.495.659; U.S. 6.737.505; U.S. 4.002.531; U.S. 4.179.337; U.S. 5.122.614; U.S. 5.183.550; U.S. 5.324.844; U.S. 5.446.090; U.S. 5.612.460; U.S. 5.643.575; U.S. 5.766.581; U.S. 5.795.569; U.S. 5.808.096; U.S. 5.900.461; U.S. 5.919.455; U.S. 5.985.263; U.S. 5.990.237; U.S. 6.113.906; U.S. 6.214.966; U.S. 6.258.351; U.S. 6.340.742; U.S. 6.413.507; U.S. 6.420.339; U.S. 6.437.025; U.S. 6.448.369; U.S. 6.461.802; U.S. 6.828.401; U.S. 6.858.736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; U.S. 2004/0235734; U.S. 2005/000360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

E. Métodos de producción de ácidos nucleicos que codifican para una hialuronidasa soluble y polipéptidos de la misma

Pueden obtenerse polipéptidos de una hialuronidasa soluble expuestos en el presente documento mediante métodos bien conocidos en la técnica para la purificación de proteínas y la expresión de proteínas recombinantes. Puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la técnica para la identificación de ácidos nucleicos que codifican para genes deseados. Puede usarse cualquier método disponible en la técnica para obtener un ADN de longitud completa (es decir, que engloba toda la región codificante) o clon de ADN genómico que codifica para una hialuronidasa, tal como de una fuente de células o tejido. Pueden modificarse por ingeniería genética hialuronidasas solubles modificadas o variantes, a partir de un polipéptido de tipo natural, tal como mediante mutagénesis dirigida al sitio. Normalmente, las hialuronidasas, incluyendo hialuronidasas solubles tales como rHuPH20, usadas en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden producirse de manera recombinante o pueden purificarse o purificarse parcialmente de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, de extractos de testículos.

Los polipéptidos pueden clonarse o aislarse usando cualquier método disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Tales métodos incluyen amplificación por PCR de ácidos nucleicos y examen de bibliotecas, incluyendo examen de hibridación de ácido nucleico, examen basado en anticuerpos y examen basado en actividad.

Pueden usarse métodos para la amplificación de ácidos nucleicos para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido deseado, incluyendo por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Puede usarse un material que contiene ácido nucleico como material de partida a partir del cual puede aislarse una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido deseado. Por ejemplo, pueden usarse preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos tisulares, muestras de fluido (por ejemplo sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos en los métodos de amplificación. Pueden usarse también bibliotecas de ácido nucleico como fuente de material de partida. Pueden diseñarse cebadores para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores basándose en secuencias expresadas a partir de las cuales se genera un polipéptido deseado. Pueden diseñarse cebadores basándose en la traducción inversa de una secuencia de aminoácidos de polipéptido. Pueden secuenciarse las moléculas de ácido nucleico generadas mediante amplificación y confirmarse para codificar un polipéptido deseado.

Pueden unirse secuencias de nucleótidos adicionales a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido, incluyendo secuencias de ligador que contienen sitios de endonucleasas de restricción para el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN que codifican para la proteína de núcleo. Además, pueden unirse

operativamente secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido. Los ejemplos de tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias de promotor diseñadas para facilitar la expresión de proteínas intracelulares, y secuencias de secreción, por ejemplo secuencias señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Tales secuencias las conocen los expertos en la técnica. Pueden unirse también secuencias de residuos de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteínas a moléculas de ácido nucleico que codifican para una enzima. Tales regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican para proteínas que facilitan la captación de una enzima dentro de células diana específicas, o de lo contrario alteran la farmacocinética de un producto de un gen sintético. Por ejemplo, pueden unirse enzimas a restos de PEG.

Además, pueden añadirse etiquetas u otros restos, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, pueden unirse también secuencias de residuos de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican para una etiqueta epitópica u otro marcador detectable a moléculas de ácido nucleico que codifican para una enzima. A modo de ejemplo de tales secuencias se incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican para una etiqueta de His (por ejemplo, 6xHis, HHHHHH; SEQ ID NO: 54) o etiqueta Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 55).

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

En realizaciones específicas, la transformación de células huésped con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de la proteína aislado, ADNc o secuencia de ADN sintetizada, permite la generación de múltiples copias del gen. Por tanto, el gen puede obtenerse en grandes cantidades haciendo crecer transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado. Generalmente, se producen hialuronidasas, incluyendo formas solubles de PH20, usando sistemas de expresión de proteínas que facilitan la N-glicosilación correcta para garantizar que el polipéptido conserva la actividad, puesto que la glicosilación es importante para la actividad catalítica y estabilidad de hialuronidasas. Tales células incluyen, por ejemplo células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo células DG44 CHO).

1. Vectores y células

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

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

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

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de hialuronidasa soluble acoplados a la secuencia señal nativa o heteróloga, así como múltiples copias de los mismos. Los vectores pueden seleccionarse para la expresión de la proteína enzimática en la célula o de manera que la proteína enzimática se exprese como una proteína secretada.

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

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

En una realización específica, se usa un vector que contiene un promotor operativamente unido a ácidos nucleicos que codifican para una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo de la misma, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibiótico). Los vectores de plásmido a modo de ejemplo para la transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor de fago T5 (reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión de operador lac doble para proporcionar expresión de alto nivel, estrechamente regulada de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión al ribosoma sintético (RBS II) para lograr una traducción eficaz, una secuencia que codifica para etiqueta de 6xHis, terminadores de la transcripción t_0 y T1, origen de replicación ColE1 y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de una etiqueta de 6xHis en el extremo o bien N- o bien C-terminal de la proteína recombinante. Tales plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30 y pQE 31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y proporcionan la expresión de proteínas etiquetadas con 6xHis en el extremo N-terminal. Otros vectores de plásmido a modo de ejemplo para la transformación de células *E. coli*

incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase la patente estadounidense 4.952.496; disponible de NOVAGEN, Madison, WI; véase también la bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Tales plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, terminador T7, el operador lac de *E. coli* inducible y el gen represor lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, terminador T7, y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-Tag™ para su uso en la purificación con una columna His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión tras la purificación sobre la columna, la región promotora T7-lac y el terminador T7.

Un vector a modo de ejemplo para la expresión en células de mamífero es el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 se derivó de la estructura principal del vector pCI (Promega). Contiene ADN que codifica para el gen de resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación F1, una región potenciadora/promotora temprana inmediata de citomegalovirus (CMV) y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El vector de expresión tiene también un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón.

2. Expresión

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

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

Pueden utilizarse también o expresarse como fusiones de proteínas polipéptidos de hialuronidasa soluble. Por ejemplo, puede generarse una fusión enzimática para añadir funcionalidad adicional a una enzima. Los ejemplos de proteínas de fusión enzimáticas incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia señal, una etiqueta tal como para la localización, por ejemplo una etiqueta de his₆ o una etiqueta myc, o una etiqueta para la purificación, por ejemplo, una fusión con GST, una secuencia para dirigir la secreción de proteínas y/o la asociación a la membrana.

a. Células procariotas

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

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

temperaturas de entre 25°C y 37°C. Normalmente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por tanto, si las proteínas requieren glicosilación para su función, puede añadirse glicosilación *in vitro* tras la purificación a partir de las células huésped.

5 b. Células de levadura

Levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son huéspedes de expresión de levaduras bien conocidos que pueden usarse para la producción de proteínas, tales como cualquiera descrita en el presente documento. La levadura puede transformarse con vectores de replicación episomales o mediante integración cromosómica estable mediante recombinación homóloga. Normalmente, se usan promotores inducibles para regular la expresión génica. Los ejemplos de tales promotores incluyen promotores de GAL1, GAL7 y GAL5 y metalotioneína, tales como CUP1, AOX1 u otro promotor de *Pichia* u otro de levadura. Los vectores de expresión incluyen a menudo un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para la selección y el mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levadura son a menudo solubles. La coexpresión con chaperoninas tales como Bip y proteína disulfuro isomerasa puede mejorar los niveles de expresión y la solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en levadura pueden dirigirse a la secreción usando fusiones con péptidos señal de secreción tales como la señal de secreción factor alfa de tipo acoplamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie celular de levadura tales como el receptor de adhesión de acoplamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adenivorans*. Puede introducirse por ingeniería genética un sitio de escisión de proteasa tal como para la proteasa Kex-2 para eliminar las secuencias fusionadas a partir de los polipéptidos expresados a medida que salen de la ruta de secreción. La levadura puede glicosilar también en motivos Asn-X-Ser/Thr.

25 c. Células de insecto

Las células de insecto, particularmente usando expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tales como polipéptidos de hialuronidasa. Las células de insecto expresan altos niveles de proteína y pueden realizar la mayoría de las modificaciones postraduccionales usadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen una gama de huéspedes restringida que mejora la seguridad y reduce los problemas regulatorios de la expresión en eucariotas. Los vectores de expresión típicos usan un promotor para la expresión a alto nivel tal como el promotor de polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus comúnmente usados incluyen los baculovirus tales como el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), y el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea celular de insectos tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para la expresión a alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que va a expresarse se fusiona inmediatamente en el sentido de 3' del codón de iniciación de polihedrina del virus. Se procesan de manera precisa señales de secreción de mamíferos en células de insecto y pueden usarse para secretar la proteína expresada al medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a sistemas de células de mamíferos.

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

45 d. Células de mamífero

Pueden usarse sistemas de expresión de mamíferos para expresar proteínas incluyendo polipéptidos de hialuronidasa soluble. Pueden transferirse constructos de expresión a células de mamífero mediante infección viral tal como adenovirus o mediante transferencia de ADN directa tal como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero incluyen normalmente un sitio de caperuza de ARNm, una caja TATA, una secuencia de inicio de la traducción (secuencia consenso Kozak) y elementos de poliadenilación. Pueden añadirse también elementos IRES para permitir la expresión bicistónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Tales vectores incluyen a menudo promotores-potenciadores de la transcripción para la expresión de alto nivel, por ejemplo el promotor-potenciador de SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV) humano y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (VSR). Estos promotores-potenciadores son activos en muchos tipos de células. Pueden usarse también para la expresión regiones potenciadoras y promotores de tipo tisular y celular. Las regiones promotoras/potenciadoras a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, las de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón, albúmina, alfa fetoproteína, alfa 1 antitripsina, beta globina, proteína básica de la mielina, cadena ligera 2 de miosina y control del gen de hormona liberadora gonadotrópica. Pueden usarse marcadores seleccionables para seleccionar y mantener células con el constructo de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforibosil transferasa, aminoglicósido fosfotransferasa,

dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa. Por ejemplo, la expresión puede realizarse en presencia de metotrexato para seleccionar sólo las células que expresan el gen de DHFR. La fusión con moléculas de señalización de la superficie celular tales como TCR- ξ y Fc ϵ RI- γ puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo sobre la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas celulares para la expresión en mamíferos incluyendo células de ratón, rata, humano, mono, pollo y hámster. Las líneas celulares a modo de ejemplo incluyen pero no se limita a células CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NSO de ratón (no secretora) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 y HKB. También están disponibles líneas celulares adaptadas a medios libres de suero que facilita la purificación de proteínas secretadas a partir del medio de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, n.º de cat. 11619-012) y la línea celular EBNA-1 libre de suero (Pham *et al.*, (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42.). También están disponibles líneas celulares que están adaptadas a crecer en medios especiales optimizados para lograr una expresión máxima. Por ejemplo, las células DG44 CHO están adaptadas a crecer en cultivo en suspensión en un medio químicamente definido, libre de productos animales.

e. Plantas

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

3. Técnicas de purificación

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

Pueden purificarse proteínas, tales como polipéptidos de hialuronidasa soluble, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en la técnica incluyendo pero sin limitarse a, SDS-PAGE, fraccionamiento por tamaño y cromatografía de exclusión molecular, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como intercambio aniónico. Pueden utilizarse también técnicas de purificación por afinidad para mejorar la eficacia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a enzimas hialuronidasa en la purificación por afinidad. Pueden modificarse también por ingeniería genética constructos de expresión para añadir una etiqueta de afinidad a una proteína tal como un epítipo myc, fusión con GST o His₆ y purificarse por afinidad con anticuerpo frente a myc, resina de glutatión y resina de Ni, respectivamente. La pureza puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo electroforesis en gel y técnicas de tinción y espectrofotométricas.

F. Preparación, formulación y administración de inmunoglobulinas y polipéptidos de hialuronidasa soluble

Se proporcionan en el presente documento coformulaciones de IG y hialuronidasa que son estables como una formulación líquida durante periodos de tiempo prolongados de al menos 6 meses a temperaturas de hasta 32°C, por ejemplo, que oscilan entre o aproximadamente 0°C y 32°C. El aumento de estabilidad se caracteriza por un tiempo de almacenamiento mejorado, fragmentación disminuida, formación de agregados disminuida, formación de dímeros disminuida o/y alteración del color disminuida, al tiempo que se conserva la actividad de la IG y hialuronidasa. Tales coformulaciones pueden proporcionarse como una formulación líquida "lista para usar" sin reconstitución adicional y/o sin ningún requisito de dilución adicional. Las coformulaciones estables resultantes

pueden dispensarse convenientemente a médicos o pacientes en formas de dosificación para inyección o administración directa. Por ejemplo, las coformulaciones pueden infundirse o inyectarse en el hogar o en cualquier lugar.

Las hialuronidasas solubles que se formulan conjuntamente con inmunoglobulina permiten la administración potenciada de inmunoglobulina a sitios deseados dentro del cuerpo aumentando la biodisponibilidad de la inmunoglobulina. Por tanto, las coformulaciones logran concentraciones elevadas y/o más rápidamente logradas de la inmunoglobulina tras la administración subcutánea en comparación con métodos de administración subcutánea convencionales, para proporcionar, por ejemplo, una respuesta más potente y/o más rápida para una dosis dada. Además, las coformulaciones de IG que contienen hialuronidasas solubles también permiten que se administren dosis inferiores de IG logrando una respuesta dada con una dosis inferior de IG administrada. Finalmente, la capacidad de una hialuronidasa soluble para potenciar el flujo de fluido a granel en y cerca de un sitio de inyección o infusión también puede mejorar otros aspectos de la administración farmacológica asociada. Por ejemplo, el aumento en el flujo de fluido a granel puede ayudar a permitir que el volumen de fluido inyectado se disperse más rápidamente desde el sitio de inyección (reduciendo potencialmente el dolor u otras consecuencias adversas de la inyección). Esto es particularmente importante para infusiones subcutáneas para permitir que se administren dosis superiores. Además de la biodisponibilidad aumentada, la coformulación de IG con hialuronidasa proporciona una vía de administración más segura o más conveniente en comparación con vías de administración intravenosas convencionales.

Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento son estables durante periodos de tiempo prolongados, incluyendo a temperaturas variables. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento son estables y conservan la actividad de la IG y hialuronidasa a temperaturas de hasta 32°C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, las coformulaciones son estables a temperaturas de "nevera", por ejemplo de 2°C a 8°C, tal como a o aproximadamente 4°C, durante al menos de 6 meses a 4 años, tal como de 1 año a 2 años, por ejemplo 6 meses, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años o al menos 4 años o más. En otro ejemplo, las coformulaciones son estables y conservan la actividad a temperatura ambiente, por ejemplo de 18°C a 32°C, generalmente de 20°C a 32°C, tal como de 28°C a 32°C, durante al menos de 6 meses a 1 año, por ejemplo 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, o al menos 1 año o más.

En particular, las coformulaciones estables presentan niveles de bajos a indetectables de agregación y/o fragmentación de IG tras el almacenamiento durante periodos de tiempo definidos. Un experto en la técnica conoce métodos para evaluar la agregación y fragmentación, y se ejemplifican en la sección G más adelante. Generalmente, no más del 0,5% al 5% de IG, por ejemplo, no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, no más del 1% y generalmente no más del 0,5% de IG en la coformulación forma un agregado, tal como se mide mediante HPSEC u otros métodos, tras el almacenamiento durante los periodos de tiempo definidos tal como se expuso anteriormente.

Además, la IG y hialuronidasa en las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento conservan una o más actividades de la actividad inicial de la IG y hialuronidasa antes del almacenamiento. Un experto en la técnica está familiarizado con las actividades de IG y hialuronidasa y puede evaluar tales actividades. La sección G proporciona actividades y ensayos a modo de ejemplo para evaluar la actividad. Normalmente, las coformulaciones líquidas estables proporcionadas en el presente documento conservan tras el almacenamiento al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, o más de la actividad inicial de la proteína antes del almacenamiento, generalmente al menos del 70% al 95% de la actividad inicial. Por ejemplo las coformulaciones líquidas estables conservan tras el almacenamiento más del 70%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 98%, más del 99%, o más del 99,5% de la actividad inicial de la proteína respectiva antes del almacenamiento.

1. Formulaciones y dosificaciones

Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento se formulan como líquidos. Las coformulaciones contienen inmunoglobulina, hialuronidasa, al menos 0,05 M de una sal de cloruro de metal alcalino, por ejemplo, al menos cloruro de sodio 0,05 M (NaCl o sal) o cloruro de potasio 0,05 M (KCl). Las coformulaciones también se ajustan en el pH para limitar la agregación y conservar la actividad de la IG y hialuronidasa. En algunos ejemplos, las coformulaciones no contienen otros componentes excepto agua o disolventes adecuados. En otros ejemplos, las coformulaciones contienen además diluyentes, portadores u otros excipientes.

Normalmente, los compuestos se formulan para dar composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, cuarta edición, 1985, 126). Se preparan composiciones farmacéuticamente aceptables en vista de su aprobación por una agencia reguladora u otra agencia preparándose según una farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y en humanos. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Las coformulaciones pueden proporcionarse como una preparación farmacéutica en forma líquida como disoluciones, jarabes o suspensiones. En forma líquida, las preparaciones farmacéuticas pueden proporcionarse como una preparación concentrada que va a diluirse hasta una concentración terapéuticamente eficaz antes de su

uso. Generalmente, las preparaciones se proporcionan en una forma de dosificación que no requiere dilución para su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). En otro ejemplo, pueden presentarse preparaciones farmacéuticas en forma liofilizada para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

El pH de las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento es tal que la IG en la coformulación no se agrega y/o la IG y hialuronidasa conservan la actividad tal como se describe en la sección G. El pH óptimo puede obtenerse mediante técnicas de formulación conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el pH óptimo puede determinarse evaluando la agregación y actividad en condiciones de pH diferentes usando diversos métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la sección G. Tales ensayos o evaluación incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión molecular, determinaciones de HSPEC, datos de estabilidad térmica, títulos anticomplemento de las preparaciones y/o ensayos de actividad hialuronidasa. Normalmente, en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento el pH puede oscilar entre 4,0 y 8,0 tal como se mide en la disolución concentrada de la coformulación. Generalmente, dentro de este intervalo, sin embargo, se desea un pH inferior para garantizar un contenido en monómero máximo. Por consiguiente, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento tienen normalmente un pH que es de al menos o aproximadamente 4,0 a 7,4, generalmente de al menos o aproximadamente 4,0 a 6,0, y normalmente de 4,4 a 4,9. Tal como se indica, el pH indicado se mide en la disolución concentrada de la formulación. El pH puede ajustarse usando agentes de acidificación para disminuir el pH o agentes de alcalinización para aumentar el pH. Los agentes de acidificación a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ácido acético, ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, disolución de fosfato de sodio monobásica y ácido fosfórico. Los agentes de alcalinización a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, disolución de fosfato de sodio dibásico, carbonato de sodio o hidróxido de sodio.

Puede usarse cualquier tampón en la preparación de la formulación líquida proporcionada en el presente documento siempre que no afecte de manera adversa a la estabilidad de la coformulación, y soporte el intervalo de pH requisito requerido. Los ejemplos de tampones particularmente adecuados incluyen tampones succinato, acetato, fosfato, citrato, aconitato, malato y carbonato. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que las formulaciones proporcionadas en el presente documento no se limitan a un tampón particular, siempre que el tampón proporcione un grado aceptable de estabilidad del pH, o "capacidad de tamponamiento" en el intervalo indicado. Generalmente, un tampón tiene una capacidad de tamponamiento adecuada dentro de aproximadamente 1 unidad de pH de su pK (Lachman *et al.* 1986). La idoneidad del tampón puede estimarse basándose en las tabulaciones de pK publicadas o puede determinarse empíricamente mediante métodos bien conocidos en la técnica. El pH de la disolución puede ajustarse al punto final deseado dentro del intervalo tal como se describió anteriormente, por ejemplo, usando cualquier ácido o base aceptable.

a. Inmunoglobulina

La IG en las coformulaciones se proporciona a una concentración que es o es de aproximadamente el 5% al 22% p/v, por ejemplo, que es o es de aproximadamente 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 120 mg/ml, 150 mg/ml, 180 mg/ml, 200 mg/ml, 220 mg/ml, 250 mg/ml o más. Generalmente, la IG en la coformulación se proporciona en una cantidad que es de al menos el 10% (100 mg/ml) al 20% (200 mg/ml), por ejemplo, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20% o más.

Las preparaciones de inmunoglobulina proporcionadas en el presente documento pueden formularse como composiciones farmacéuticas para uso de dosificación individual o múltiple. Normalmente, tal como se indica en otra parte en el presente documento, la IG en la coformulación se formula en una cantidad tal que está lista para su uso y no es necesaria una dilución adicional. Dependiendo de si la coformulación se proporciona como una formulación de dosificación individual o múltiple, un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad exacta de IG en la coformulación.

Generalmente, la inmunoglobulina se proporciona en una cantidad terapéuticamente eficaz para el régimen de dosificación particular. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente sometiendo a prueba los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos, tales como los ensayos proporcionados en el presente documento. La concentración de una inmunoglobulina seleccionada en la composición depende de las tasas de absorción, inactivación y excreción del complejo, las características fisicoquímicas del complejo, el programa de dosificación y la cantidad administrada así como otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se entiende que la dosificación y duración del tratamiento precisas es una función del tejido que está tratándose y puede determinarse empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o mediante extrapolación a partir de datos de prueba *in vivo* o *in vitro*. Se indica que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado. Se entiende además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y

que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son a modo de ejemplo sólo y no pretenden limitar el alcance del mismo. La cantidad de una preparación de inmunoglobulina seleccionada que va a administrarse para el tratamiento de una enfermedad o un estado, por ejemplo una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG, puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. Por tanto, la dosificación precisa, que puede determinarse empíricamente, puede depender de la preparación de inmunoglobulina particular, el régimen y programa de dosificación con la hialuronidasa soluble, la vía de administración, el tipo de enfermedad que va a tratarse y la gravedad de la enfermedad.

Por ejemplo, pueden formularse preparaciones de IG en composiciones farmacéuticas para lograr regímenes de dosificación (dosis y frecuencias) para las que se preparan preparaciones intravenosas (IGIV) actuales y se administran para enfermedades o estados particulares que pueden tratarse con IG. Un experto en la técnica está familiarizado con regímenes de dosificación para administración de IGIV de enfermedades o estados particulares. Por ejemplo, la sección H más adelante proporciona regímenes de dosificación (dosis y frecuencias) a modo de ejemplo de IG para enfermedades y estados particulares. Los expertos en la técnica conocen bien otros regímenes de dosificación. Si es necesario, puede determinarse empíricamente o extrapolarse un protocolo de de dosificación y duración y tratamiento particular.

Por ejemplo, pueden usarse dosis a modo de ejemplo de inmunoglobulina administrada por vía intravenosa como punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas. Pueden determinarse niveles de dosificación basándose en una variedad de factores, tales como el peso corporal del individuo, la salud general, la edad, la actividad del compuesto específico empleado, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el juicio del médico encargado. Generalmente, las dosificaciones de inmunoglobulina son de desde o aproximadamente 100mg por kg peso corporal (es decir 100 mg/kg de PC) hasta 2 g/kg de PC. Se entiende que la cantidad que va a administrarse será una función de la indicación tratada, y que se tolerarán posiblemente los efectos secundarios. Las dosificaciones pueden determinarse empíricamente usando modelos reconocidos para cada trastorno.

En un ejemplo, se proporciona IG en una cantidad que permite la administración subcutánea de una dosis equivalente a una dosis i.v. de una vez al mes para la indicación particular que está tratándose. En un ejemplo de este tipo, pueden formularse preparaciones de inmunoglobulina para la administración de dosis individual en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis de una vez al mes, pero puede proporcionarse en cantidades menores para administraciones de dosificaciones múltiples. Por ejemplo, pueden administrarse dosis de una vez al mes de preparaciones de IG diariamente, semanalmente, bisemanalmente o una vez al mes. Los regímenes de dosificación pueden continuar durante meses o años. La dosis i.v. de una vez al mes particular es una función de la enfermedad que va a tratarse, y por tanto puede variar.

Los intervalos de dosificaciones individuales a modo de ejemplo, en particular para administración subcutánea de IG, son de desde o aproximadamente 1 gramo (g) hasta 200 g, por ejemplo, 1 gramo (g), 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g o 200 g. La dosificación particular y formulación de la misma depende de la indicación y el individuo. Por ejemplo, las dosificaciones pueden administrar sede 50 mg/kg de peso corporal (PC) a 600 mg/kg, PC, por ejemplo 50 mg/kg de peso corporal (PC), 100 mg/kg de PC, 200 mg/kg de PC, 300 mg/kg de PC, 400 mg/kg de PC, 500 mg/kg de PC, 600 mg/kg de PC, o más. Si es necesario, la dosificación puede determinarse empíricamente. Para lograr tales dosificaciones, los volúmenes de coformulaciones que contienen IG administradas por vía subcutánea pueden ser de o aproximadamente 10 ml a 700 ml, por ejemplo, de 100 ml a 500ml, tal como de 200 ml a 400 ml. Por ejemplo, los volúmenes de cofomulaciones que contienen IG administradas por vía subcutánea pueden ser de o aproximadamente 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 100 ml, 200ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml o más para administración de dosificación individual. Por ejemplo, una formulación de IG líquida del 10% (100 mg/ml) para indicaciones descritas en el presente documento puede administrarse en un volumen de 200 ml a 700 ml para lograr una dosificación individual de 20 g a 70 g de IG. En otro ejemplo, una formulación de IG líquida del 20% (200 mg/ml) para indicaciones descritas en el presente documento puede administrarse en un volumen de 100 ml a 350 ml para lograr una dosificación individual similar de 20 g a 70 g de IG. Tal como se indica, puede proporcionarse la IG en menores cantidades en la coformulación para administraciones de dosificación múltiple.

b. Hialuronidasa

La hialuronidasa seleccionada, en particular una hialuronidasa soluble, por ejemplo, rHuPH20, se incluye en la coformulación a una concentración que es de o aproximadamente 50 U/ml a 300 U/ml, por ejemplo 50 U/ml, 75 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml o 500 U/ml, normalmente de al menos 100 U/ml a 300 U/ml, generalmente a una concentración que es de 75 U/ml a 350 U/ml. Si se desea, la hialuronidasa puede proporcionarse en una forma más concentrada, por ejemplo de o aproximadamente 1000 U/ml a 5000 U/ml, tal como 1000 U/ml, 1500 unidades/ml, 2000 U/ml, 4000 U/ml o 5000 U/ml.

La hialuronidasa en la coformulación puede formularse como composiciones farmacéuticas para administración de dosificación individual o múltiple. Tal como se indicó anteriormente para IG, la hialuronidasa en la coformulación

normalmente se formula en una cantidad que está lista para usar de manera que no es necesaria una dilución adicional. Dependiendo de si la formulación se proporciona como una forma de dosificación individual o múltiple, un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad exacta de hialuronidasa que va a incluirse en la coformulación.

Generalmente, la hialuronidasa seleccionada, en particular una hialuronidasa soluble, por ejemplo, rHuPH20, se incluye en la coformulación en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil de la IG en ausencia de efectos secundarios no deseados en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente sometiendo a prueba los polipéptidos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos tal como usando los ensayos proporcionados en el presente documento o conocidos en la técnica (véanse por ejemplo, Taliani *et al.* (1996) *Anal. Biochem.*, 240: 60-67; Filocamo *et al.* (1997) *J Virology*, 71: 1417-1427; Sudo *et al.* (1996) *Antiviral Res.* 32: 9-18; Buffard *et al.* (1995) *Virology*, 209:52-59; Bianchi *et al.* (1996) *Anal. Biochem.*, 237: 239-244; Hamatake *et al.* (1996) *Intervirology* 39:249-258; Steinkuhler *et al.* (1998) *Biochem.*, 37:8899-8905; D'Souza *et al.* (1995) *J Gen. Virol.*, 76:1729-1736; Takeshita *et al.* (1997) *Anal. Biochem.* 247:242-246; véanse también por ejemplo, Shimizu *et al.* (1994) *J. Virol.* 68:8406-8408; Mizutani *et al.* (1996) *J. Virol.* 70:7219-7223; Mizutani *et al.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227:822-826; Lu *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 93:1412-1417; Hahm *et al.*, (1996) *Virology*, 226:318-326; Ito *et al.* (1996) *J. Gen. Virol.*, 77:1043-1054; Mizutani *et al.* (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212:906-911; Cho *et al.* (1997) *J. Virol. Met.* 65:201-207 y luego extrapolarse a partir de los mismos para dosificaciones para humanos.

Por ejemplo, una dosis terapéuticamente eficaz de hialuronidasa para administración de dosificación individual es de o aproximadamente 500 unidades a 500.000 unidades, por ejemplo, de 1000 unidades a 100.000 unidades de hialuronidasa. Por ejemplo, la hialuronidasa puede administrarse, en particular para administración subcutánea, a o aproximadamente 500 unidades, 1000 unidades, 2000 unidades, 5000 unidades, 10.000 unidades, 30.000 unidades, 40.000 unidades, 50.000 unidades, 60.000 unidades, 70.000 unidades, 80.000 unidades, 90.000 unidades, 100.000 unidades o más. Tal como se indica, la hialuronidasa puede proporcionarse en cantidades menores en la coformulación para administraciones de dosificación múltiple.

En algunos ejemplos, las dosificaciones pueden proporcionarse como una razón de IG administrada. Por ejemplo, la hialuronidasa puede administrar sede 10 U/gramo (g) a 2000 U/g o más de IG, por ejemplo, a o aproximadamente 10 U/g, 20 U/g, 30 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 200 U/g, 250 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g, 1000 U/g, 1500 U/g, 2000 U/g, 3000 U/g de IG o más. En general, la razón de hialuronidasa con respecto a IG en un producto coformulado es mayor que la razón cuando los mismos productos (IG y hialuronidasa) y la misma cantidad de IG se administran por vía subcutánea por separado, por ejemplo, en una administración de vanguardia. Por tanto, generalmente la razón es de al menos 100 U/g, y generalmente 250 U/g o más, por ejemplo de 100 U/g a 3000 U/g de IG, tal como de 250 U/g a 1000 U/g, y en particular de 250 U/g a 750 U/g, tal como 500 U/g de IG. Por ejemplo, una coformulación que contiene hialuronidasa 100 U/ml, cuando se coformula con un 20% de IG (200 mg/ml), se proporciona a una razón que es o es de aproximadamente 500 U/g de IG. Normalmente, los volúmenes administrados por vía subcutánea pueden ser de o aproximadamente 10 ml a 700 ml, tal como de 50ml a 500 ml, por ejemplo de 100 ml a 400 ml para una administración de dosificación individual. Por ejemplo, los volúmenes administrados por vía subcutánea pueden ser de o aproximadamente 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml o más para administración de dosificación individual.

c. Sal de cloruro de metal alcalino

La coformulación proporcionada en el presente documento contiene una sal de cloruro de metal alcalino que es al menos 0,05 M. La sal de cloruro de metal alcalino incluye, pero no se limita a, cloruro de sodio (NaCl) o cloruro de potasio (KCl). Normalmente, la sal de cloruro de metal alcalino, por ejemplo NaCl o KCl, se proporciona para conservar la estabilidad y actividad de la hialuronidasa. La cantidad exacta de sal puede determinarse empíricamente por un experto en la técnica. Por ejemplo, la cantidad de sal en las formulaciones puede determinarse evaluando la agregación y actividad en condiciones de sal diferentes usando diversos métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la sección G. Normalmente, en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento, se proporciona cloruro de sodio en una cantidad que es de o aproximadamente 0,05 M a 0,3 M, por ejemplo, a o aproximadamente 0,05 M, 0,06 M, 0,07 M, 0,08 M, 0,09 M, 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M o más. Normalmente, la cantidad de sal es de entre 0,05 M y 0,25 M, por ejemplo 0,15M.

d. Estabilizador de aminoácido

La coformulación proporcionada en el presente documento contiene un estabilizador de aminoácido, que contribuye a la estabilidad de la preparación. El estabilizador puede ser un aminoácido no polar y básico. Los aminoácidos no polares y básicos incluyen, pero no se limitan a, alanina, histidina, arginina, lisina, ornitina, isoleucina, valina, metionina, glicina y prolina. Por ejemplo, el estabilizador de aminoácido es glicina o prolina, normalmente glicina. El estabilizador puede ser un aminoácido individual o puede ser una combinación de 2 o más de tales aminoácidos. Los estabilizadores de aminoácido pueden ser aminoácidos naturales, análogos de aminoácido, aminoácidos modificados o equivalentes de aminoácido. Generalmente, el aminoácido es un L-aminoácido. Por ejemplo, cuando

se usa prolina como estabilizador, es generalmente L-prolina. También es posible usar equivalentes de aminoácido, por ejemplo, análogos de prolina.

Generalmente, se añade a la disolución una cantidad de uno o más aminoácidos eficaz para mantener la inmunoglobulina en forma monomérica. La concentración de estabilizador de aminoácido, por ejemplo glicina, incluida en la coformulación líquida oscila entre aminoácido 0,1 M y 1 M, normalmente 0,1 M y 0,75 M, generalmente 0,2 M y 0,5 M, por ejemplo, al menos a o aproximadamente 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M, 0,45 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M, 0,75 M o más. El aminoácido, por ejemplo glicina, puede usarse en una forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, acetato, etc. La pureza del aminoácido, por ejemplo glicina, debe ser de al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 99,5% o más.

e. Otros agentes

Opcionalmente, las coformulaciones pueden incluir portadores tales como un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra una hialuronidasa o IG. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada o forma parcialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintéticos, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y disoluciones de dextrosa acuosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables.

Por ejemplo, los portadores farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de Ringer con dextrosa y lactato. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Pueden añadirse agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales envasadas en recipientes de múltiples dosis, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres metílicos y propílicos del ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen polisorbato 80 (TWEENS 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste del pH.

Las composiciones pueden contener junto con un principio activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato de dicalcio o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábica, gelatina, glucosa, melazas, polivinilpirrolidona, celulosas y derivados de las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes de este tipo conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, puede añadirse una proteína excipiente a la coformulación que puede ser cualesquiera varias proteínas o péptidos farmacéuticamente aceptables. Generalmente, la proteína excipiente se selecciona por su capacidad para administrarse a un sujeto mamífero sin provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la albúmina sérica humana es muy adecuada para su uso en formulaciones farmacéuticas. Otros excipientes proteicos farmacéuticos conocidos incluyen, pero no se limitan a, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche en polvo desnatada, glicerol, propileno, glicol, agua, y etanol. El excipiente se incluye en la formulación a una concentración suficiente para prevenir la adsorción de la proteína al vial o recipiente de contención. La concentración del excipiente variará según la naturaleza del excipiente y la concentración de la proteína en la coformulación.

Una composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitano, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros de tales agentes.

2. Formas de dosificación

Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden formularse como formas de dosificación individuales o múltiples. Por ejemplo, puesto que la coformulación proporcionada en el presente documento es

estable a lo largo de periodos de tiempo prolongados, la coformulación puede proporcionarse en forma de dosificación múltiple para su administración a lo largo de un intervalo de días, semanas, meses o años. Por tanto, la coformulación líquida puede prepararse como formas de dosificación unitarias. La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de modo que una inyección proporciona una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. Por ejemplo, cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. La dosis exacta depende de la edad, el peso y el estado del paciente o animal tal como se conoce en la técnica.

Pueden administrarse formas de dosis unitarias en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitarias idénticas envasadas en un único recipiente que van a administrarse en forma de dosis unitaria separada. Por tanto, una forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no se separan en el envasado.

Las preparaciones parenterales de dosis unitaria se envasan en una ampolla, un vial o una jeringa con una aguja. El volumen de disolución líquida que contiene el compuesto farmacéuticamente activo es una función de la enfermedad que va a tratarse y el artículo de fabricación particular elegido para el envase. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, tal como se conoce y se pone en práctica en la técnica. Cuando se proporciona como una preparación de múltiples dosis, la formulación puede contener un agente bacteriostático.

3. Administración

Las composiciones coformuladas proporcionadas en el presente documento se formulan normalmente para administración parenteral, por ejemplo, por la vía subcutánea. Debido al aumento de biodisponibilidad de IG en coformulaciones con hialuronidasa, las inmunoglobulinas pueden administrarse por vía subcutánea a dosificaciones y frecuencias para las que se preparan y administran preparaciones intravenosas actuales (IGIV). Las ventajas con respecto a las formulaciones subcutáneas actuales de IG es que la hialuronidasa/IG coformulada puede dar como resultado regímenes de dosificación más favorables, por ejemplo, dosificación menos frecuente. Mediante una dosificación inferior o menos frecuente, pueden reducirse efectos secundarios asociados con toxicidad. Generalmente, la farmacocinética y/o farmacodinámica de la terapia con IG subcutánea mejoran. Además, las administraciones subcutáneas de IG tienen también ventajas con respecto a las infusiones intravenosas actuales. Por ejemplo, una infusión subcutánea permite la infusión por el paciente o la familia en contraposición a una enfermera con experiencia; la infusión puede lograrse a velocidades superiores de manera que la IG se infunde en 1-3 horas en comparación con 5-10 horas para terapias con IGIV convencionales; no hay ningún requisito de venas funcionales; no ha ningún efecto secundario relacionado con la infusión tal como trombosis, cefalea, tromboflebitis y náuseas y menos probabilidad de acontecimientos adversos; y la infusión puede realizarse en el hogar o en cualquier lugar.

También se desea la administración subcutánea para garantizar que las hialuronidasas se administren de modo que alcancen el intersticio de la piel o los tejidos, degradando de ese modo el espacio intersticial para la administración posterior de la inmunoglobulina. Por tanto, se contempla la administración directa bajo la piel, tal como mediante métodos de administración subcutánea.

La administración puede ser local, tópica o sistémica dependiendo del lugar de tratamiento. La administración local a una zona que necesita tratamiento puede lograrse mediante, por ejemplo, pero sin limitarse a, infusión local, aplicación tópica, por ejemplo, conjuntamente con un apósito para heridas tras cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante. Generalmente, la administración local se logra mediante inyección, tal como a partir de una jeringa u otro artículo de fabricación que contiene un dispositivo de inyección tal como una aguja. En otro ejemplo, la administración local puede lograrse mediante infusión, que puede facilitarse mediante el uso de una bomba u otro dispositivo similar.

También se contemplan otros modos de administración. La composición farmacéutica puede formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración. La vía más adecuada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores, tales como la naturaleza de la enfermedad, el progreso de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad, la composición particular que se usa. Otras vías de administración, tales como cualquier vía conocida por los expertos en la técnica, incluyen pero no se limitan a inyección intramuscular, intravenosa, intradérmica, intralesional, intraperitoneal, epidural, administración nasal, oral, vaginal, rectal, tópica, local, ótica, por inhalación, bucal (por ejemplo, sublingual) y transdérmica o cualquier vía. Un experto en la técnica conoce formulaciones adecuadas para tales vías.

Las composiciones también pueden administrarse con otros agentes biológicamente activos, o bien secuencialmente, de manera intermitente o en la misma composición. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada que incluyen formulaciones de liberación controlada y liberación controlada por dispositivo, tal como por medio de una bomba.

Se contempla en el presente documento administración subcutánea, generalmente caracterizada por inyección o

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

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

Cuando se administran volúmenes grandes, la administración es normalmente mediante infusión. Pueden dosificarse sujetos a velocidades de infusión a o de aproximadamente 0,5 ml/kg/PC/h a 5 ml/kg/PC/h, por ejemplo a o de aproximadamente 0,5 ml/kg/PC/h, 1 ml/kg/PC/h, 2 ml/kg/PC/h, 3 ml/kg/PC/h, 4 ml/kg/PC/h o 5 ml/kg/PC/h. La velocidad de infusión puede determinarse empíricamente, y normalmente es una función de la tolerabilidad del sujeto. Si se produce una reacción adversa durante la infusión, la velocidad puede ralentizarse hasta la velocidad inmediatamente por debajo de la que se produjo el acontecimiento adverso. Si el acontecimiento adverso se resuelve en respuesta a la reducción de la velocidad, la velocidad de infusión puede aumentarse lentamente a criterio del médico. La infusión subcutánea de coformulaciones de IG puede facilitarse mediante gravedad, infusión con bomba o inyección de una dosis deseada, por ejemplo, una dosis de 20-30 gramos completa. Generalmente, para las infusiones pueden emplearse bombas de infusión intravenosa. Las coformulaciones de IG/hialuronidasa pueden infundirse a velocidades a o de aproximadamente 5 ml/h, 10 ml/h, 30 ml/h, 60 ml/h, 120 ml/h, 240 ml/h o 300ml/h. Las velocidades de infusión pueden aumentarse durante el transcurso del tratamiento siempre que la infusión se tolere por el paciente. Generalmente, el tiempo de administración de la infusión es de o aproximadamente 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 4 h o más. Debido a la alta velocidad de infusión lograda mediante la administración subcutánea de IG coformulada con hialuronidasa, el tiempo de infusión es significativamente menor que para terapias con IGIV convencionales. Cuando el tiempo de infusión supera el límite deseado, puede iniciarse un segundo sitio de infusión al criterio del médico y el sujeto. El segundo sitio se inicia normalmente al menos 10 cm separado del sitio inicial.

Un experto en la técnica conoce técnicas para la infusión, y están dentro del conocimiento de un médico encargado. Generalmente, la dosis apropiada de coformulación de IG/hialuronidasa puede reunirse en una bolsa i.v. convencional. Por ejemplo, puede usarse un conjunto de infusión sin ventilación que tiene un orificio en Y cerca de su extremo. Puede insertarse una aguja de infusión subcutánea de calibre 24 en un sitio de preferencia del sujeto, aunque se recomiendan el abdomen y secundariamente los muslos debido al volumen de disolución que va a infundirse. La hialuronidasa e IG pueden proporcionarse en el mismo aparato de orificio en Y. También pueden usarse otros artículos de fabricación en el presente documento para fines de infusión por gravedad o una bomba, e incluyen, pero no se limitan a tubos, frascos, jeringas u otros recipientes.

En el caso de que una infusión no se tolere (por ejemplo, provoca reacciones locales de moderadas a graves), puede iniciarse un segundo sitio de infusión de modo que el sujeto reciba la dosificación completa.

Además, se entiende que las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento son propensas a regímenes de dosificación que implican una frecuencia de administración periódica. Por ejemplo, la frecuencia de dosificación puede ser diaria a lo largo de un intervalo de tiempo dado a lo largo de días consecutivos o alternos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días. En otros ejemplos, el régimen de dosificación es semanal, por ejemplo, una vez cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas o más. Por tanto, una preparación de IG/hialuronidasa puede administrarse de una vez, o puede dividirse en varias dosis más pequeñas que van a administrarse a intervalos de tiempo. Las preparaciones de IG/hialuronidasa seleccionadas pueden administrarse en una o más dosis a lo largo del transcurso de un tiempo de tratamiento por ejemplo a lo largo de varias horas, días, semanas o meses. En algunos casos, la administración

continua es útil. Se entiende que la dosificación precisa y el transcurso de la administración depende de la indicación y la tolerabilidad del paciente.

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

G. Métodos de evaluación de la estabilidad, actividad, biodisponibilidad y farmacocinética

La estabilidad y actividad de IG y hialuronidasa en las formulaciones puede evaluarse usando diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* que conoce un experto en la técnica. Están disponibles en la técnica diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90(1993). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado.

Los ensayos para evaluar el tamaño molecular (por ejemplo provocado por agregación, desnaturalización y/o fragmentación) de la IG son una consideración importante para evaluar la estabilidad de la coformulación. Además, la estabilidad de las formulaciones líquidas también puede evaluarse mediante cualquier ensayo que mida la actividad biológica de IG y hialuronidasa en la formulación. Tales ensayos se conocen bien en la técnica. Además de evaluar la estabilidad de la coformulación, tales ensayos pueden usarse, por ejemplo, para determinar las dosificaciones apropiadas de inmunoglobulina y hialuronidasa, y la frecuencia de dosificación, para el tratamiento. Además, también pueden realizarse ensayos conocidos por un experto en la técnica para evaluar las propiedades farmacocinéticas de inmunoglobulina administrada por vía subcutánea, incluyendo biodisponibilidad y tolerabilidad.

1. Tamaño molecular

El principal parámetro que indica estabilidad es el tamaño molecular, y un cambio en el tamaño puede ser el resultado de degradación por desnaturalización, agregación o fragmentación. La agregación de IG es un problema común durante el almacenamiento de productos de IG. Los agregados son problemáticos porque pueden combinarse con el complemento en la sangre del paciente y producir una reacción anticomplemento. La capacidad de IG para unirse al complemento aumenta en gran medida como resultado de la desnaturalización, en particular por agregación con especies de alto peso molecular. El mecanismo de unión al complemento de estos agregados parece ser idéntico al de complejos antígeno-anticuerpo. Marcus, D. M., (1960) J. Immunol. 84:273-284. En el caso de IgG, se sabe que el sitio de unión al complemento requiere dos moléculas próximas entre sí. Por tanto es posible que se requiera un empaquetamiento crítico de las moléculas, en vez de cualquier cambio conformacional adecuado.

Están disponibles en la técnica métodos para monitorizar la estabilidad de IG, incluyendo los métodos descritos en el presente documento y en los ejemplos dados a conocer en el presente documento. Hay diversos métodos disponibles para evaluar la estabilidad de formulaciones de proteína, incluyendo formulaciones de anticuerpo o inmunoglobulina, basándose en las estructuras físicas y químicas de las proteínas así como en sus actividades biológicas. Por ejemplo, para estudiar la agregación, fragmentación y desnaturalización de proteínas, están disponibles métodos tales como absorción de transferencia de carga, análisis térmico, espectroscopía de fluorescencia, dicroísmo circular, RMN, electroforesis en gel capilar reducida (rCGE) y cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HPSEC). Véase, por ejemplo, Wang *et al.*, 1988, J. of Parenteral Science & Technology 42(supp.):S4-S26. La rCGE y HPSEC son los métodos más comunes y más sencillos para evaluar el tamaño molecular debido a la formación de agregados proteicos, degradación de proteínas y fragmentación de proteínas. Además, la actividad anticomplemento (ACA) puede determinarse directamente.

Por ejemplo, la estabilidad de las formulaciones líquidas puede evaluarse mediante HPSEC o rCGE, cuando el porcentaje de área de los picos representa la proteína no degradada. En un ejemplo, se inyecta proteína en una columna TosoH Biosep TSK G3000 SW 600 x 7,5 mm. Se eluye la proteína. Se detecta la proteína eluida usando absorbancia UV a 280 nm. Se procesa un patrón de referencia en el ensayo como control, y los resultados se notifican como el tanto por ciento de área del pico de monómero de producto en comparación con todos los otros picos excluyendo el pico de volumen incluido. Los picos que eluyen más temprano que el pico de monómero se

registran como porcentaje de agregado.

El título de ACA también puede determinarse tal como se describe en la farmacopea europea (European Pharmacopeia, 1997, 2ª ed. Part II. Maisonneuve, S.A., Saint Ruffine, Francia). Generalmente, el título de ACA es un indicador de especificación de administración intravenosa (i.v.) y no es relevante para la administración subcutánea de las coformulaciones. Por tanto, para fines en el presente documento, el título de ACA no es generalmente un indicador determinante para coformulaciones que se formulan para administración subcutánea.

Generalmente, el ensayo de ACA mide la cantidad de complemento a la que se une la mezcla de cantidades normalizadas de complemento y proteína (véase por ejemplo, Palmer, D. F. y Whaley, S. D., Complement Fixation Test, en Manual of Clinical Laboratory Immunology (Ed. N. R. Rose, *et al.*, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1986) págs. 57-66.; Mayer, M. M., Quantitative C' Fixación Analysis, Complement and Complement Fixation, en Experimental Immunochemistry (Ed. E. A. Kabat y M. M. Meyer, Thomas, Springfield, Ill., 1961), págs. 214-216, 227-228). En resumen, se añaden glóbulos rojos que se han sensibilizado mediante preincubación con anticuerpos frente a glóbulos rojos a la mezcla de complemento/proteína. En presencia de complemento libre (al que no se ha unido todavía la proteína) estas células sensibilizadas se lisan, liberando hemoglobina que puede cuantificarse como una medida del grado de lisis. En paralelo, también se añaden glóbulos rojos sensibilizados a una mezcla de control de tampón-complemento, cuyo grado de lisis se define como el 100%. La diferencia entre la cantidad real de complemento necesaria para proporcionar el 100% de lisis y la cantidad de complemento que queda sin unir en presencia de proteína es igual a la cantidad de complemento a la que realmente se une la proteína, o actividad anticomplemento. Una unidad de actividad ACA (una unidad de CH_{50}) es la cantidad de proteína que puede activar el 50% del complemento en un sistema de complemento titulado de manera óptima y glóbulos rojos/hemolisina. Generalmente, un título de ACA aceptable es inferior al 50% de unidades de CH_{50} consumidas por mg de proteína.

En otro ejemplo, la distribución de tamaño molecular, por ejemplo debido a formación de agregados, durante el almacenamiento de una coformulación líquida puede determinarse fácilmente midiendo el cambio en la proteína soluble en disolución a lo largo del tiempo. La cantidad de polipéptido soluble en disolución puede cuantificarse mediante varios ensayos analíticos. Tales ensayos pueden incluir, por ejemplo, HPLC de fase inversa (RP) y espectroscopía de absorción UV. La determinación de agregados tanto solubles como insolubles durante el almacenamiento en formulaciones líquidas puede lograrse, por ejemplo, usando ultracentrifugación analítica para distinguir entre la porción del polipéptido soluble que está presente como agregados solubles y la porción que está presente en la forma molecular no agregada, biológicamente activa.

En un ejemplo adicional, la estabilidad de coformulaciones puede evaluarse calentando el producto terminado hasta una temperatura de 57°C y manteniéndolo a esa temperatura durante cuatro horas mientras se examina el producto para detectar precipitados visuales. (Véase por ejemplo, Code of Federal Regulations 21, Food and Drugs, 640.101a (revisado en abril de 1978)). En una modificación del método (véase por ejemplo, Fernandes y Lundblad, Vox Sang 39:101-112 (1980)), se calientan aproximadamente 2 mililitros del producto de prueba a 57°C durante cuatro horas y luego se evalúa el porcentaje de cambio en el grado de opalescencia tal como se mide registrando la transmitancia a 580 nm con un espectrofotómetro de laboratorio (véase también la patente estadounidense n.º 4.597.966).

También puede usarse SDS-PAGE para evaluar la agregación y/o fragmentación. Puede medirse la densidad o la radioactividad de cada banda teñida o marcada con radioisótopo y puede obtenerse el % de densidad o % de radioactividad de la banda que representa proteína no degradada.

Generalmente, las coformulaciones presentan niveles de bajos a indetectables de agregación tal como se mide mediante cualquiera de los ensayos anteriores, por ejemplo HPSEC o rCGE. Por ejemplo, la agregación no es mayor del 5%, no mayor del 4%, no mayor del 3%, no mayor del 2%, no mayor del 1%, y generalmente no mayor del 0,5% de agregado por peso de proteína, y niveles de bajos a indetectables de fragmentación, es decir, el 80% o más, el 85% o más, el 90% o más, el 95% o más, el 98% o más, o el 99% o más, o el 99,5% o más del área de pico total en el/los pico(s) que representan anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, normalmente, una agregación aceptable incluye $\geq 90\%$ de monómeros y oligo-/dímeros; $\leq 5\%$ de agregados y $\leq 5\%$ de fragmentos.

2. Actividad biológica

a. Inmunoglobulina

La capacidad de la inmunoglobulina para actuar como agente terapéutico puede evaluarse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de la inmunoglobulina para neutralizar la infectividad viral o bacteriana (Hiemstra *et al.*, (1994) J Lab Clin Med 123:241-6). Pueden utilizarse otros ensayos *in vitro* para evaluar otras actividades biológicas de la inmunoglobulina. Por ejemplo, la capacidad de preparaciones de inmunoglobulina para interactuar con y modular productos de activación del complemento, unirse a un anticuerpo idiopático, unirse a receptores de Fc en macrófagos y suprimir diversos mediadores inflamatorios incluyendo citocinas, quimiocinas y metaloproteinasas, puede evaluarse usando cualquier método conocido en la técnica,

incluyendo, pero sin limitarse a, ELISA, inmunotransferencia de tipo Western, transferencia de tipo Northern y citometría de flujo para evaluar la expresión de marcadores. Por ejemplo, el efecto de la inmunoglobulina sobre la expresión de receptores de quimiocina en células mononucleares de sangre periférica puede evaluarse usando citometría de flujo (Trebst *et al.*, (2006) Eur J Neurology 13(12):1359-63). En otro ejemplo, el efecto de la inmunoglobulina sobre la expresión de metaloproteinasas en macrófagos puede evaluarse usando análisis de transferencia de tipo Northern (Shapiro *et al.*, (2002) Cancer 95:2032-2037).

También pueden realizarse estudios *in vivo* usando modelos animales para evaluar la actividad terapéutica de la inmunoglobulina. La inmunoglobulina puede administrarse a modelos animales infectados con uno o más microorganismos y el efecto sobre la progresión de la infección puede evaluarse, tal como midiendo el número de microorganismos o midiendo el peso como marcador de morbilidad. El efecto terapéutico de la inmunoglobulina también puede evaluarse usando modelos animales de las enfermedades y los estados para los que se considera la terapia usando inmunoglobulina. Tales modelos animales se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, modelos animales pequeños para agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), SCID, síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Guillain-Barré, ITP, polimiositis, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia grave y síndrome de Moersch-Woltmann (Czitrom *et al.* (1985) J Immunol 134:2276-2280, Ellmeier *et al.*, (2000) J Exp Med. 192: 1611-1624, Ohno (2006) Drug Discovery Today: Disease Models 3:83-89, Oyaizu *et al.* (1988) J Exp Med 2017-2022, Hansen *et al.*, (2002) Blood 100:2087-2093, Strongwater *et al.*, (1984) Arthritis Rheum. 27:433-42, Kim *et al.* (1998) Annals NY Acad Sci 841:670-676, Christadoss *et al.* (2000) Clin. Immunol. 94:75-87, Sommer *et al.*, (2005) Lancet 365:1406-1411 y la patente estadounidense n.º 7.309.810).

b. Hialuronidasa

La actividad hialuronidasa puede evaluarse usando métodos bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, la actividad se mide usando un ensayo de microturbidez. Esto se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con albúmina sérica. La actividad se mide incubando hialuronidasa con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo fijado (por ejemplo 10 minutos) y luego precipitando el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina sérica acidificada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm tras un periodo de revelado adicional. La disminución en la turbidez resultante de la actividad hialuronidasa sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática hialuronidasa. En otro ejemplo, la actividad hialuronidasa se mide usando un ensayo de microtitulación en el que se mide el ácido hialurónico biotinilado residual tras la incubación con hialuronidasa (véase por ejemplo Frost y Stem (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, publicación de patente estadounidense n.º 20050260186). Los grupos carboxilo libres en los residuos de ácido glucurónico del ácido hialurónico están biotinilados, y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado se acopla covalentemente a una placa de microtitulación. Tras la incubación con hialuronidasa, se detecta el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual usando una reacción de avidina-peroxidasa, y se compara con el obtenido tras la reacción con patrones de hialuronidasa de actividad conocida. También se conocen en la técnica otros ensayos para medir la actividad hialuronidasa y pueden usarse en los métodos en el presente documento (véase por ejemplo Delpech *et al.*, (1995) Anal. Biochem. 229:35-41; Takahashi *et al.*, (2003) Anal. Biochem. 322:257-263).

También puede evaluarse la capacidad de la hialuronidasa para actuar como agente de extensión o difusión. Por ejemplo, puede inyectarse colorante azul tripano por vía subcutánea con o sin hialuronidasa en la piel lateral de cada costado de ratones desnudos. Entonces se mide el área con colorante, tal como con un microcalibre, para determinar la capacidad de la hialuronidasa para actuar como agente de extensión (patente estadounidense n.º 20060104968).

3. Farmacocinética y tolerabilidad

Pueden realizarse estudios de farmacocinética y tolerabilidad usando modelos animales o pueden realizarse durante estudios clínicos con pacientes. Los modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, cobayas y modelos de primates no humanos, tales como monos cynomolgus o macacos rhesus. En algunos casos, se realizan estudios de farmacocinética y tolerabilidad usando animales sanos. En otros ejemplos, los estudios se realizan usando modelos animales de una enfermedad para la que se considera la terapia con inmunoglobulina, tales como modelos animales de cualquiera de las enfermedades y los estados descritos más adelante.

La farmacocinética de la inmunoglobulina administrada por vía subcutánea puede evaluarse midiendo parámetros tales como la concentración de inmunoglobulina en plasma máxima (pico) ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo pico (es decir cuándo se produce la concentración de inmunoglobulina en plasma máxima; $T_{m\acute{a}x}$), la concentración de inmunoglobulina en plasma mínima (es decir la concentración en plasma mínima entre dosis de inmunoglobulina; $C_{m\acute{i}n}$), la semivida de eliminación ($T_{1/2}$) y el área bajo la curva (es decir el área bajo la curva generada representando gráficamente el tiempo frente a la concentración de inmunoglobulina en plasma; AUC), tras la administración. La biodisponibilidad absoluta de la inmunoglobulina administrada por vía subcutánea se determina comparando el área bajo la curva de inmunoglobulina tras la administración subcutánea (AUC_{sc}) con el AUC de inmunoglobulina tras administración intravenosa (AUC_{iv}). La biodisponibilidad absoluta (F) puede calcularse usando la fórmula: $F = ([AUC]_{sc} \times dosis_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times dosis_{iv})$. La concentración de inmunoglobulina en el plasma tras la administración subcutánea

puede medirse usando cualquier método conocido en la técnica adecuado para evaluar concentraciones de inmunoglobulina en muestras de sangre. Los métodos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ELISA y nefelometría.

5 Puede administrarse un intervalo de dosis y frecuencia de dosificación diferente de dosificación en los estudios farmacocinéticos para evaluar el efecto de aumentar o disminuir las concentraciones de inmunoglobulina y/o hialuronidasa en la dosis. Las propiedades farmacocinéticas de inmunoglobulina administrada por vía subcutánea, tal como la biodisponibilidad, también puede evaluarse con o sin coadministración de hialuronidasa. Por ejemplo, puede administrarse a perros, tales como perros beagle, inmunoglobulina administrada por vía subcutánea en combinación con hialuronidasa, o sola. Las dosis intravenosas de inmunoglobulina también se administran a otro grupo de perros beagle. Entonces se toman muestras de sangre a diversos puntos de tiempo y se determina la cantidad de inmunoglobulina en el plasma, tal como mediante nefelometría. Puede medirse entonces el AUC y puede determinarse la biodisponibilidad de inmunoglobulina administrada por vía subcutánea administrada con o sin hialuronidasa. Tales estudios pueden realizarse para evaluar el efecto de la coadministración con hialuronidasa sobre las propiedades farmacocinéticas, tales como biodisponibilidad, de inmunoglobulina administrada por vía subcutánea.

También se conocen en la técnica estudios para evaluar la seguridad y tolerabilidad y pueden usarse en el presente documento. Tras la administración subcutánea de inmunoglobulina, con o sin coadministración de hialuronidasa, puede monitorizarse el desarrollo de cualquier reacción adversa. Las reacciones adversas pueden incluir, pero sin limitarse a, reacciones en el sitio de inyección, tales como edema o hinchazón, cefalea, fiebre, fatiga, tiritonas, enrojecimiento, mareo, urticaria, sibilancia u opresión en el pecho, náuseas, vómitos, escalofríos, dolor de espalda, dolor de pecho, calambres musculares, temblores o convulsiones, cambios en la tensión arterial y respuestas de hipersensibilidad anafilácticas o graves. Normalmente, se administra un intervalo de dosis y frecuencias de dosificación diferentes en los estudios de seguridad y tolerabilidad para evaluar el efecto de aumentar o disminuir las concentraciones de inmunoglobulina y/o hialuronidasa en la dosis.

H. MÉTODOS DE TRATAMIENTO Y USOS TERAPÉUTICOS

30 Las coformulaciones de IG/hialuronidasa descritas en el presente documento pueden usarse para tratamiento de cualquier estado para el que se emplea la inmunoglobulina. La inmunoglobulina (IG) puede administrarse por vía subcutánea en coformulaciones con hialuronidasa, para tratar cualquier estado que sea propenso al tratamiento con inmunoglobulina. Esta sección proporciona usos terapéuticos a modo de ejemplo de coformulaciones de IG/hialuronidasa. Se entiende que las coformulaciones de IG/hialuronidasa proporcionadas en el presente documento pueden usarse en métodos, procedimientos o usos para tratar cualquiera de las enfermedades y los estados descritos más adelante y otras enfermedades y estados conocidos por un experto en la técnica que pueden tratarse con IG. En particular, se contempla la administración subcutánea de las coformulaciones. Las dosificaciones de IG administradas son iguales o similares a la dosificación administrada por vía intravenosa y conocida por un experto en la técnica. El régimen y frecuencia de dosificación puede variar con respecto a regímenes intravenosos tal como se describe en otra parte en el presente documento. Los usos terapéuticos descritos a continuación son a modo de ejemplo y no limitan las aplicaciones de los métodos descritos en el presente documento.

45 Por ejemplo, pueden usarse coformulaciones proporcionadas en el presente documento para tratar inmunodeficiencias tales como inmunodeficiencias primarias, tales como agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, hipogammaglobulinemia y estados de inmunidad comprometida adquirida (inmunodeficiencias secundarias), tales como las que se caracterizan por bajos niveles de anticuerpos; enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias; e infecciones agudas. Los usos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, terapia de sustitución con inmunoglobulina y terapia de inmunomodulación para diversas enfermedades y estados inmunológicos, hematológicos, neurológicos, inflamatorios, dermatológicos y/o infecciosos. En algunos ejemplos, la inmunoglobulina se administra para aumentar la respuesta inmunitaria en pacientes sanos, tal como tras una posible exposición a una enfermedad infecciosa (por ejemplo lesión por pinchazo accidental con una aguja). Las coformulaciones de IG proporcionadas en el presente documento también pueden usarse para tratar esclerosis múltiple (especialmente esclerosis múltiple remitente-recidivante o RRMS), enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Está dentro del conocimiento de un médico encargado identificar tales enfermedades o estados.

55 Las coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa pueden administrarse en combinación con otros agentes usados en el tratamiento de estas enfermedades y estados. Por ejemplo, otros agentes que pueden administrarse incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, agentes quimioterápicos, agentes antiinflamatorios esteroideos, agentes antiinflamatorios no esteroideos y otros agentes inmunomoduladores tales como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento.

65 Si es necesario, un protocolo de dosificación y duración y tratamiento particular puede determinarse empíricamente o extrapolarse. Por ejemplo, pueden usarse dosis a modo de ejemplo de inmunoglobulina administrada por vía intravenosa como punto de partida para determinar las dosificaciones apropiadas. Los niveles de dosificación pueden determinarse basándose en una variedad de factores, tales como peso corporal del individuo, salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de

excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el juicio del médico encargado. Se proporcionan en otra parte en el presente documento dosificaciones a modo de ejemplo de inmunoglobulina y hialuronidasa. Se entiende que la cantidad que va a administrarse será una función de la indicación tratada, y que se tolerarán posiblemente los efectos secundarios. Las dosificaciones pueden determinarse empíricamente usando modelos reconocidos para cada trastorno.

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

1. Inmunodeficiencia primaria y secundaria

a. Inmunodeficiencia primaria

La Organización Mundial de la Salud reconoce más de 80 enfermedades de inmunodeficiencia primaria y se producen en aproximadamente 1 de cada 10.000 individuos. Estas enfermedades se caracterizan por un defecto intrínseco en el sistema inmunitario en el que, en algunos casos, el cuerpo no puede producir ninguno o suficientes anticuerpos contra la infección. En otros casos, las defensas celulares para combatir la infección no funcionan apropiadamente. La inmunoglobulina puede usarse para tratar la inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos. Por tanto, la inmunoglobulina puede administrarse como terapia de sustitución con inmunoglobulina para pacientes que presentan tales enfermedades.

Normalmente, las inmunodeficiencias primarias son trastornos heredados. A modo de ejemplo de inmunodeficiencias primarias se incluyen, pero sin limitarse a, inmunodeficiencia variable común (CVID), deficiencia de IgA selectiva, deficiencia de subclases de IgG, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), inmunodeficiencia combinada grave (SCID), trastornos del complemento, ataxia telangiectasia, hiper-IgM y síndrome de Wiskott-Aldridge. Pueden administrarse coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa por vía subcutánea a pacientes con enfermedades de inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos a dosis similares a las dosis usadas para la administración intravenosa de inmunoglobulina. Las dosis a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, entre 100 mg/kg de PC y 800 mg/kg de PC de inmunoglobulina, a intervalos de cuatro semanas. La dosis puede aumentarse o disminuirse, así como la frecuencia de las dosis, dependiendo de la respuesta clínica.

b. Inmunodeficiencia secundaria

La inmunodeficiencia secundaria, o adquirida, no es el resultado de anomalías genéticas heredadas, sino que más bien se produce en individuos en los que el sistema inmunitario está comprometido por factores fuera del sistema inmunitario. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, traumatismo, virus, quimioterapia, toxinas y contaminación. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es un ejemplo de un trastorno de inmunodeficiencia secundaria provocado por un virus, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en el que un agotamiento de linfocitos T hace que el cuerpo no pueda combatir la infección.

Otro ejemplo, hipogammaglobulinemia, está provocada por una falta de linfocitos B, se caracteriza por bajos niveles de anticuerpos en la sangre y puede producirse en pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), linfoma no Hodgkin (NHL) y otros tumores malignos relevantes como resultado de tanto disfunción inmunitaria relacionada con leucemia como inmunosupresión relacionada con la terapia. Los pacientes con hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a tales tumores malignos hematológicos, y los pacientes que reciben trasplante de células madre poshematopoyéticas son susceptibles a infecciones bacterianas. La deficiencia en inmunidad humoral es en gran medida responsable del aumento del riesgo de morbilidad relacionada con infección en estos pacientes, especialmente por microorganismos encapsulados. Por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*, así como *Legionella* y *Nocardia spp.* son patógenos bacterianos frecuentes que provocan neumonía en pacientes con CLL. También se han observado infecciones oportunistas como *Pneumocystis carinii*, hongos, virus y micobacterias. El número y la gravedad de las infecciones en estos pacientes pueden reducirse significativamente mediante la administración de inmunoglobulina (Griffiths et al. (1989) Blood 73:366-368; Chapel et al. (1994) Lancet 343:1059-1063).

Por tanto, pueden administrarse coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa por vía subcutánea en tales pacientes para prevenir infecciones recurrentes. Las dosificaciones a modo de ejemplo incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a tumores malignos hematológicos. Por ejemplo, pueden administrarse coformulaciones que contienen aproximadamente 400 mg/kg de PC de inmunoglobulina por vía subcutánea cada de 3 a 4 semanas. En un ejemplo adicional, puede administrarse una dosis adicional de 400 mg/kg de PC en el primer mes de terapia en casos en los que la IG sérica del paciente es inferior a 4 g/l. La cantidad de inmunoglobulina administrada, y la frecuencia de las dosis, puede aumentarse o disminuirse según sea apropiado.

2. Enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias

a. Enfermedad de Kawasaki

5 La enfermedad de Kawasaki es una enfermedad aguda, febril, multisistémica de niños y lactantes jóvenes, que implica a menudo las arterias coronarias. También se conoce como síndrome de ganglios linfáticos, enfermedad de ganglios monocutáneos, poliarteritis infantil y síndrome de Kawasaki. La enfermedad de Kawasaki es una vasculitis auto limitada, mal entendida que afecta a muchos órganos, incluyendo la piel, las membranas mucosas, los ganglios linfáticos, las paredes de los vasos sanguíneos, y el corazón. Puede producirse aneurisma de arterias coronarias a partir de la segunda semana de enfermedad durante la fase convaleciente. Aunque la causa del estado se desconoce, hay evidencias de que la vasculitis característica resulta de una reacción inmunitaria caracterizada por activación de células T y macrófagos frente a un antígeno desconocido, secreción de citocinas, hiperactividad de células B policlonales, y la formación de autoanticuerpos frente a células endoteliales y células del músculo liso. En individuos genéticamente susceptibles, uno o más agentes infecciosos comunes no caracterizados, posiblemente actividad de superantígeno, pueden desencadenar la enfermedad.

La inmunoglobulina administrada de manera temprana en la enfermedad de Kawasaki puede prevenir la patología de arterias coronarias. La administración subcutánea de coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa a pacientes con inflamación en curso asociada con enfermedad de Kawasaki puede mejorar los síntomas. Las dosificaciones a modo de ejemplo incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con enfermedad de Kawasaki. Por ejemplo, a un paciente con enfermedad de Kawasaki pueden administrársele aproximadamente 1-2 g/kg de peso corporal del paciente de inmunoglobulina. Esto puede administrarse, por ejemplo, en cuatro dosis de 400 mg/kg de PC durante cuatro días consecutivos. En otro ejemplo, se administra 1 g/kg de PC de inmunoglobulina como una única dosis a lo largo de un periodo de 10 horas. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede aumentarse o disminuirse según sea apropiado.

b. Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica

La polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) es un trastorno neurológico caracterizado por debilidad progresiva y función sensorial alterada en las piernas y los brazos. El trastorno, que se denomina algunas veces polineuropatía recidivante crónica, está provocada por daño a la vaina de mielina de los nervios periféricos. Aunque puede producirse a cualquier edad y en ambos géneros, la CIDP es más común en adultos jóvenes, y en hombres más que en mujeres. A menudo se presenta con síntomas que incluyen cosquilleo o entumecimiento (que comienza en los dedos de los pies y de las manos), debilidad de los brazos y las piernas, pérdida de reflejos de tendones profundos (areflexia), fatiga y sensaciones anómalas. La CIDP está estrechamente relacionada con el síndrome de Guillain-Barré y se considera el homólogo crónico de esa enfermedad aguda. No hay una prueba de diagnóstico específica, pero hallazgos clínicos y de laboratorio característicos ayudan a distinguir este trastorno de otros síndromes neuropáticos mediados por el sistema inmunitario.

Los estudios indican que el tratamiento con inmunoglobulina reduce los síntomas (van Schaik *et al.* (2002) *Lancet Neurol.* 1:497-498). Por tanto, pueden administrarse coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa por vía subcutánea a pacientes que presentan CIDP usando los métodos descritos en el presente documento. Las dosificaciones a modo de ejemplo incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con CIDP. En un ejemplo, se le administran a un paciente con CIDP aproximadamente 2 g/kg de PC de inmunoglobulina por vía subcutánea, en combinación con hialuronidasa. Esto puede administrarse, por ejemplo, en cinco dosis de 400 mg/kg de PC durante cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede aumentarse o disminuirse según sea apropiado.

c. Síndrome de Guillain-Barré

El síndrome de Guillain-Barré es un trastorno autoinmunitario neurológico que implica desmielinización inflamatoria de nervios periféricos. Los primeros síntomas incluyen grados variables de debilidad o sensaciones de cosquilleo en las piernas, que pueden extenderse a los brazos y la parte superior del cuerpo. Estos síntomas pueden aumentar de intensidad hasta que los músculos no pueden usarse en absoluto y el paciente queda casi totalmente paralizado, dando como resultado un estado potencialmente mortal. Aunque la recuperación es generalmente buena o completa en la mayoría de los pacientes, se ha notificado incapacidad persistente en aproximadamente el 20% de todos los pacientes y muerte en el 4 al 15% de los pacientes. El síndrome de Guillain-Barré puede producirse unos pocos días o semanas tras los síntomas de una infección viral respiratoria o gastrointestinal. En algunos casos, la cirugía o las vacunaciones pueden desencadenar el síndrome. El trastorno puede desarrollarse a lo largo del transcurso de horas o días, o puede durar hasta de 3 a 4 semanas. Una prueba de velocidad de conducción nerviosa (NCV) puede proporcionar a un doctor claves para ayudar en el diagnóstico. En algunos casos, puede usarse una punción lumbar en el diagnóstico, ya que el líquido cefalorraquídeo en pacientes con síndrome de Guillain-Barré contiene normalmente más proteína que los sujetos normales.

Aunque no hay cura conocida para el síndrome de Guillain-Barre, el tratamiento con inmunoglobulina puede reducir la gravedad de la enfermedad y acelerar la recuperación. Pueden administrarse coformulaciones de

inmunoglobulina/hialuronidasa por vía subcutánea a pacientes a una dosis apropiada de IG, tal como, por ejemplo, una dosis similar a la dosis usada para administrar inmunoglobulina por vía intravenosa a pacientes con síndrome de Guillain-Barré. Por ejemplo, se le administran a un paciente con síndrome de Guillain-Barré aproximadamente 2 g/kg de PC de inmunoglobulina, en combinación con hialuronidasa, por vía subcutánea. Esto puede administrarse, por ejemplo, en cinco dosis de 400 mg/kg de PC durante cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede aumentarse o disminuirse dependiendo de, por ejemplo, la gravedad de la enfermedad y la respuesta clínica a la terapia, que puede evaluarse fácilmente por un experto en la técnica.

d. Púrpura trombocitopénica idiopática

La púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), también conocida como púrpura trombocitopénica inmunitaria primaria y púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, es una reducción en el recuento de plaquetas (trombocitopenia) que resulta del acortamiento de la supervivencia de las plaquetas debido a anticuerpos anti-plaquetas. Cuando los recuentos de plaquetas son muy bajos (por ejemplo, $<30 \times 10^9/l$), pueden producirse hemorragias en la piel (púrpura) y las membranas mucosas. La producción de plaquetas en la médula ósea (megacariopoyesis) en pacientes con ITP es morfológicamente normal. En algunos casos, hay una alteración adicional de la función de las plaquetas relacionada con la unión de anticuerpos a glicoproteínas en la superficie de las plaquetas. La ITP puede presentarse como formas crónicas y agudas. Aproximadamente el 80% de los adultos con ITP tienen la forma crónica de la enfermedad. La mayor incidencia de ITP crónica es en mujeres con edades de 15-50 años, aunque algunos informes sugieren una incidencia creciente con la edad. La ITP es relativamente común en pacientes con VIH. Aunque la ITP puede encontrarse en cualquier fase de la infección, su prevalencia aumenta a medida que avanza la enfermedad de VIH.

Los estudios han demostrado que puede usarse inmunoglobulina para tratar pacientes con ITP (Godeau *et al.* (1993) Blood 82(5):1415-21; Godeau *et al.* (1999) Br. J. Haematol. 107(4):716-9). Pueden administrarse coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa por vía subcutánea a pacientes a una dosis de IG similar a la dosis usada para administrar inmunoglobulina por vía intravenosa para tratar pacientes con ITP. Por ejemplo, a un paciente con ITP pueden administrársele de aproximadamente 1 a 2 g/kg de PC de inmunoglobulina, en combinación con hialuronidasa, por vía subcutánea. Esto puede administrarse a lo largo de varios días, o puede administrarse en una dosis. En algunos ejemplos, se administran cinco dosis de 400 mg/kg de PC de inmunoglobulina en días consecutivos. En otro ejemplo, se administra 1 g/kg de PC durante 1-2 días consecutivos, dependiendo del recuento de plaquetas y la respuesta clínica. La cantidad de inmunoglobulina administrada, y la frecuencia de las dosis, pueden aumentarse o disminuirse dependiendo de, por ejemplo, el recuento de plaquetas y la respuesta clínica a la terapia, lo que puede evaluar fácilmente un experto en la técnica.

e. Miopatías inflamatorias

Las miopatías inflamatorias son un grupo de enfermedades musculares que implican la inflamación y degeneración de tejidos de músculo esquelético. Estos trastornos adquiridos se presentan todos con debilidad muscular significativa y la presencia de una respuesta inflamatoria dentro del músculo.

i. Dermatomiositis

La dermatomiositis (DM) es la más fácilmente reconocida de las miopatías inflamatorias debido a su erupción distintiva, que se produce como una erupción en parches, oscura, rojiza o lila en los párpados, las mejillas y el puente de la nariz, y en la espalda o la parte superior del pecho, los codos, las rodillas y los nudillos. En algunos pacientes, se desarrollan bajo la piel nódulos calcificados o bultos endurecidos. La erupción precede a menudo a la debilidad muscular, que normalmente se desarrolla a lo largo de un periodo de semanas, pero puede desarrollarse a lo largo de meses o incluso días. Puede producirse dermatomiositis en cualquier edad desde la infancia hasta la edad adulta, y es más común en mujeres que en hombres. Aproximadamente un tercio de los pacientes con DM notifican dificultad para tragar. Más del 50% de los niños con DM se quejan de dolor muscular y sensibilidad, mientras que esto se produce generalmente en menos del 25% de los adultos con DM.

ii. Polimiositis

La polimiositis (PM) no tiene la erupción característica de la dermatomiositis, y el comienzo de la debilidad muscular progresa habitualmente más lentamente que en DM. Muchos pacientes con PM presentan dificultad para tragar. En algunos casos, los pacientes tienen también dificultad para respirar debido a insuficiencia muscular. Tantos como un tercio de los pacientes con PM tienen dolor muscular. La enfermedad afecta a más mujeres que hombres, y raramente afecta a personas por debajo de 20 años de edad, aunque se han notificado casos de polimiositis en niños y lactantes.

iii. Miositis por cuerpos de inclusión

La miositis por cuerpos de inclusión (IBM) es muy similar a la polimiositis. El comienzo de la debilidad muscular en la IBM es habitualmente muy gradual, teniendo lugar a lo largo de meses o años. Difiere de la PM en que se ven

afectados músculos tanto proximales como distales, mientras que generalmente sólo los músculos proximales se ven afectados en PM. Los hallazgos típicos incluyen debilidad de los músculos flexores de las muñecas y los músculos flexores de los dedos. La atrofia de los antebrazos y el músculo cuádriceps es característica de la enfermedad, con grados variables de debilidad en otros músculos. Aproximadamente la mitad de los pacientes aquejados de IBM tienen dificultad para tragar. Los síntomas de IBM comienzan habitualmente tras la edad de 50, aunque no se excluye ningún grupo de edad. Se produce IBM más frecuentemente en hombres que en mujeres. Aproximadamente uno de diez casos de IBM puede ser hereditario.

Los estudios indican que la administración de inmunoglobulina puede beneficiar a pacientes con estas miopatías inflamatorias. La inmunoglobulina puede mejorar la fuerza muscular, reducir la inflamación y reducir la progresión y gravedad de la enfermedad (Dalakas *et al.* (1993) *N. Engl. J. Med.* 329(27):1993-2000; Dalakas *et al.* (2001) *Neurology* 56(3):323-7; Dalakas (2004) *Pharmacol. Ther.* 102(3):177-93; Walter *et al.* (2000) *J. Neurol.* 247(1):22-8). Pueden administrarse coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa por vía subcutánea a pacientes con DM, PM o IBM a una dosis de IG similar a la dosis usada para administrar inmunoglobulina por vía intravenosa. Por ejemplo, pueden administrarse 2 g/kg de PC de inmunoglobulina, normalmente a lo largo de varios días, tal como, por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg de PC en días consecutivos.

f. Síndrome miasténico de Lambert-Eaton

El síndrome miasténico de Lambert-Eaton (LEMS) es un trastorno autoinmunitario poco común de la transmisión neuromuscular reconocido clínicamente por primera vez en asociación con cáncer de pulmón, y posteriormente en casos en los que no se detectó neoplasia. Los pacientes con LEMS tienen un defecto de la unión neuromuscular presináptica. La enfermedad se caracteriza clínicamente por debilidad muscular proximal, con aumento de la fuerza tras el ejercicio, signos oculomotores leves, reflejos de tendones profundos deprimidos y disfunción autónoma (boca seca, estreñimiento, disfunción eréctil).

La administración subcutánea de coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa a pacientes con LEMS puede mejorar los síntomas. Las dosificaciones a modo de ejemplo de IG en las coformulaciones incluyen las usadas para la administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con LEMS. Por ejemplo, a un paciente con LEMS pueden administrársele 2 g/kg de PC de inmunoglobulina a lo largo de varias dosis. Por ejemplo, pueden administrarse cinco dosis de 400 mg/kg de PC de inmunoglobulina en cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede aumentarse o disminuirse según sea apropiado.

g. Neuropatía motora multifocal

La neuropatía motora multifocal (MMN) con bloqueo de la conducción es una neuropatía desmielinizante mediada por el sistema inmunitario adquirida con debilidad lentamente progresiva, fasciculaciones y calambres, sin implicación sensorial significativa. La duración de la enfermedad antes del diagnóstico oscila entre varios meses y más de 15 años. La causa precisa de MMN se desconoce. Los estudios histopatológicos y de electrodiagnóstico demuestran la presencia de lesión tanto desmielinizante como axonal. Se ven afectados principalmente los nervios motores, aunque se ha demostrado desmielinización leve en nervios sensoriales también. La eficacia del tratamiento inmunomodulador e inmunosupresor apoya adicionalmente la naturaleza inmunitaria de MMN. Los títulos de anticuerpos anti-GM1 están elevados en más de la mitad de los pacientes con MMN. Aunque el papel de los anticuerpos anti-GM1 en la enfermedad se desconoce, su presencia puede usarse como marcador de diagnóstico para MMN.

La administración subcutánea de coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa a pacientes con MMN puede mejorar los síntomas. Las dosificaciones a modo de ejemplo de IG en las coformulaciones incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con MMN. Por ejemplo, a un paciente con MMN pueden administrársele 2 g/kg de PC de inmunoglobulina a lo largo de varias dosis. Por ejemplo, pueden administrarse cinco dosis de 400 mg/kg de PC de inmunoglobulina en cinco días consecutivos. En otro ejemplo, puede administrarse 1g/kg de PC en 2 días consecutivos. A algunos pacientes puede administrárseles terapia de mantenimiento, que puede incluir, por ejemplo, dosis de 400 mg/kg de PC a 2 g/kg de PC, administradas cada 2-6 semanas. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede aumentarse o disminuirse según sea apropiado, teniendo en cuenta la respuesta del paciente.

h. Miastenia grave

La miastenia grave (MG) es una enfermedad neuromuscular autoinmunitaria crónica caracterizada por grados variables de debilidad de los músculos esqueléticos del cuerpo. Está asociada con la presencia de anticuerpos frente a receptores de acetilcolina (AChR) o tirosina cinasa específica de músculo (MuSK) en la unión neuromuscular, aunque algunos pacientes son negativos para anticuerpos. Las características clínicas de la MG incluyen debilidad y fatiga fluctuante de músculos voluntarios, particularmente los músculos palpebral elevador, extraocular, bulbar, de extremidades y respiratorios. Los pacientes presentan habitualmente parálisis unilateral o bilateral de los párpados (ptosis), visión doble (diplopia), dificultad para tragar (disfagia) y debilidad de músculos proximales. La debilidad de músculos respiratorios puede dar como resultado insuficiencia respiratoria en varios

casos, o en exacerbaciones graves agudas (crisis miasténica). La miastenia grave se produce en todos los grupos étnicos y en ambos géneros. Afecta más comúnmente a mujeres adultas jóvenes por debajo de 40 años y hombres más mayores por encima de 60 años, pero puede producirse a cualquier edad. En algunos casos, se realiza timectomía para reducir los síntomas.

Puede usarse inmunoglobulina, por ejemplo, como terapia de mantenimiento para pacientes con MG de moderada a grave, normalmente cuando otros tratamientos han sido ineficaces o provocado efectos secundarios graves, y también puede administrarse antes de la timectomía o durante una exacerbación aguda de la enfermedad (crisis miasténica). Pueden administrarse coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa por vía subcutánea a pacientes con MG usando los métodos descritos en el presente documento. Las dosificaciones a modo de ejemplo de IG en las coformulaciones incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con MG. Por ejemplo, a un paciente con MG pueden administrarse dosis de 400 mg/kg de PC a 2 g/kg de PC cada 4-6 semanas para terapia de mantenimiento. Antes de la timectomía o durante la crisis miasténica, pueden administrarse 1-2 g/kg de PC a lo largo de varias dosis, tal como, por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg de PC en cinco días consecutivos. En otro ejemplo, puede administrarse 1 g/kg de PC en 2 días consecutivos.

i. Síndrome de Moersch-Woltmann

El síndrome de Moersch-Woltmann, también conocido como síndrome de la persona rígida (SPS) o síndrome del hombre rígido, es un trastorno neurológico poco común con características de una enfermedad autoinmunitaria. Los pacientes presentan síntomas relacionados con rigidez muscular y espasmos episódicos superpuestos. La rigidez muscular se extiende implicando músculos axiales, principalmente abdominal y toracolumbar, así como músculos de extremidades proximales. Normalmente, la contracción conjunta de músculos agonistas y antagonistas del tronco conduce a un aspecto similar a una tabla con hiperlordosis. Menos frecuentemente, la implicación de músculos respiratorios conduce a dificultad para respirar y la implicación de músculos faciales a un rostro similar a una máscara.

El tratamiento con inmunoglobulina puede efectuar una disminución de la rigidez y un aumento de las puntuaciones de sensibilidad en pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann (Dalakas *et al.* (2001) N. Engl. J. Med. 345(26):1870-6). Pueden administrarse coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa por vía subcutánea a pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann usando los métodos descritos en el presente documento. Las dosificaciones a modo de ejemplo de IG en las coformulaciones incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann. Por ejemplo, puede administrarse inmunoglobulina a dosis de 400 mg/kg de PC en cinco días consecutivos. A algunos pacientes puede administrarse terapia de mantenimiento, que puede incluir, por ejemplo, 1-2 g/kg de PC de inmunoglobulina cada 4-6 semanas. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede aumentarse o disminuirse según sea apropiado.

3. Infecciones agudas

También se ha mostrado que la inmunoglobulina tiene actividad antimicrobiana contra varias infecciones bacterianas, virales y fúngicas, incluyendo, pero sin limitarse a, *Haemophilus influenzae* tipo B; *Pseudomonas aeruginosa* tipos A y B; *Staphylococcus aureus*; estreptococos del grupo B; *Streptococcus pneumoniae* tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19 y 23; adenovirus tipos 2 y 5; citomegalovirus; virus de Epstein-Barr VCA; virus de la hepatitis A; virus de la hepatitis B; virus del herpes simple-1; virus del herpes simple-2; influenza A; sarampión; parainfluenza tipos 1, 2 y 3; polio; virus de la varicela zóster; *Aspergillus*; y *Candida albicans*. Por tanto, pueden administrarse coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa por vía subcutánea a pacientes con infecciones bacterianas, virales y fúngicas para aumentar el sistema inmunitario del paciente y tratar la enfermedad. En algunos ejemplos, también se administran antibióticos u otros agentes antimicrobianos.

4. Otras enfermedades y estados

A modo de ejemplo de otras enfermedades y estados que pueden tratarse mediante terapia con IG y no descritos anteriormente se incluyen, pero sin limitarse a, inmunodeficiencia iatrogénica; deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomiелitis diseminada aguda; vasculitis necrotizante sistémica positiva para ANCA; anemia hemolítica autoinmunitaria; penfigoide ampolloso; penfigoide cicatricial; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria con trombocitopenia inmunitaria); trombocitopenia aloinmunitaria feto-materna/neonatal (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatía paraproteínica de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia mioclónica opsoclónica; pénfigo foliáceo; pénfigo vulgar; púrpura tras transfusión; necrólisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (DIEZ/SJS); síndrome de choque tóxico; lupus eritematoso sistémico; mieloma múltiple; septicemia; trasplante de médula ósea; tumores de células B; y enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, incluye tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (véanse por ejemplo, Dodel *et al.* (2004) J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 75:1472-4; Solomon *et al.* (2007) Curr. Opin. Mol. Ther. 9:79-85; Relkin *et al.* (2008) Neurobiol Aging). La IG contiene anticuerpos que se unen a amiloide beta (AB), que es un componente central de la placa en los cerebros de pacientes con Alzheimer. Por tanto, la IG puede ayudar a

promover el aclaramiento de AB del cerebro y bloquear los efectos tóxicos de AB en células cerebrales. Por tanto, pueden administrarse coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa por vía subcutánea a pacientes con enfermedad de Alzheimer usando los métodos descritos en el presente documento. Los sujetos que van a tratarse incluyen pacientes que tienen enfermedad de Alzheimer leve, moderada o avanzada. Está dentro del nivel de conocimiento de un médico encargado identificar pacientes para el tratamiento. Pueden administrarse coformulaciones de inmunoglobulina/hialuronidasa cada semana, cada dos semanas o una vez al mes. El tratamiento puede continuar a lo largo del transcurso de meses o años. Las coformulaciones pueden administrarse a dosis de IG a o entre 200 mg/kg de PC y 2 g/kg de PC cada semana o cada dos semanas, y generalmente de al menos 200 mg/kg a 2 g/kg de PC al menos una vez al mes. El tratamiento con inmunoglobulina puede efectuar un aumento en los niveles de anticuerpo anti-amiloide beta del paciente en comparación con los niveles antes del tratamiento.

I. Artículos de fabricación y kits

Las composiciones farmacéuticas de coformulaciones de inmunoglobulina y hialuronidasa pueden envasarse como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para tratar una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG, y una etiqueta que indica que la composición va a usarse para tratar enfermedades y estados que pueden tratarse con IG. A modo de ejemplo de artículos de fabricación son recipientes de una única cámara y recipientes de doble cámara. Los recipientes incluyen, pero no se limitan a, tubos, frascos y jeringas. Los recipientes pueden incluir además una aguja para administración subcutánea.

Los artículos de fabricación proporcionados en el presente documento contienen materiales de envasado. Los expertos en la técnica conocen bien materiales de envasado para su uso en productos farmacéuticos de envasado. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 5.323.907, 5.033.252 y 5.052.558, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, envases de tipo blíster, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, frascos, y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo de administración y tratamiento previsto. Se contempla una amplia gama de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento ya que hay una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad o un estado que puede tratarse con IG.

Las composiciones de coformulaciones de inmunoglobulina y una hialuronidasa soluble también pueden proporcionarse como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y un elemento para su administración. Por ejemplo las composiciones pueden suministrarse con un dispositivo para su administración, tal como una jeringa, un inhalador, una copa de dosificación, un cuentagotas o un aplicador. El kit puede incluir, opcionalmente, instrucciones para su aplicación incluyendo dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y un elemento para el diagnóstico. Por ejemplo, tales kits pueden incluir un elemento para medir la concentración, cantidad o actividad de IG.

j. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para fines ilustrativos sólo y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1 Preparación de Gammagard Liquid (formulaciones del 10% de inmunoglobulina (IG))

Se fabricó Gammagard Liquid (el 10% de IG) a partir de grandes conjuntos de plasma humano, examinados meticulosamente para detectar agentes infecciosos. Se purificaron inmunoglobulinas a partir de conjuntos de plasma usando un procedimiento de fraccionamiento de Cohn-Oncley modificado con etanol frío (Cohn *et al.* (1946) J Am. Chem. Soc. 68:459-467), así como cromatografía de intercambio aniónico y catiónico (Teschner *et al.* (2007) Vox Sang. 92:42-55). Se sometió además la proteína purificada a tres etapas de inactivación/eliminación viral independientes: tratamiento con disolvente/detergente (S/D) (Horowitz *et al.* (1994) Blood Coagul. Fibrin. 5(3):S21-528; Kreil *et al.* (2003) Transfusion 43:1023-1038), nanofiltración por 35 nm (Hamamoto *et al.* (1989) Vox Sang. 56:230-236; Yuasa *et al.* (1991) J. Gen. Virol. 72:2021-2024), y una incubación a pH bajo a temperaturas elevadas (Kempf *et al.* (1991) Transfusion 31:423-427; Louie *et al.* (1994) Biologicals 22:13-19). El procedimiento de S/D incluyó tratamiento con una mezcla orgánica de fosfato de tri-n-butilo, octoxinol-9 y polisorbato-80 de 18 a 25°C durante un mínimo de 60 minutos (Pölsler *et al.*, (2008) Vox Sang. 94:184-192).

Las preparaciones finales usadas en los estudios fueron preparaciones líquidas del 10% de anticuerpos de inmunoglobulina G (IG) altamente purificada y concentrada formuladas en glicina 0,25 mM a pH de 4,6 a 5,1 (tal como se mide en la disolución concentrada). La glicina sirve como agente estabilizante y de tamponamiento, y no hay azúcares añadidos, sodio o conservantes. Todos los lotes del 10% de IG (por ejemplo los lotes LE12H020, LE12H062, LE12H173, LE12F047) eran sustancialmente similares. La osmolalidad era de 240 a 300 mOsmol/kg, que es similar a la osmolalidad fisiológica. La distribución de las subclases de IG del producto fabricado según el procedimiento descrito anteriormente era similar a la del plasma normal: siendo al menos el 98% de la preparación de proteína IgG, la concentración de IgA promedio era de 37 µg/ml (ninguno de estos lotes tenía una concentración

de IgA de >140 µg/ml) y estaba presente IgM sólo en cantidades traza. Las funciones de Fc y Fab se mantuvieron. No era detectable actividad de activador de precalicreína.

Ejemplo 2

Preparación de SUBQ NG 20% (el 20% de IG)

A. Producción de una composición de IG concentrada, purificada

a. Sumario

Se separó plasma reunido previamente congelado de donantes de sangre en una muestra de plasma crioempobrecido para el aislamiento de diversos inhibidores y factores de coagulación en bruto antes del fraccionamiento posterior con alcohol frío usando un procedimiento de fraccionamiento de Cohn modificado tal como se describe por *Teschner et al.* (2007) *Vox Sang.* 92:42-55. El procedimiento de fraccionamiento con alcohol proporcionó una fracción de IG intermedia principal, denominada precipitado G, que se procesó adicionalmente para dar el producto final usando purificación cromatográfica. La fabricación posterior implicó intercambio catiónico (CM-Sepharose Fast Flow) y cromatografía de intercambio aniónico (ANX-Sepharose Fast Flow). Para proporcionar un alto margen de seguridad con respecto a la posible transmisión de virus, se integraron en el procedimiento de fabricación tres etapas de inactivación/eliminación de virus especializadas, que se complementan entre sí en su modo de acción, concretamente: tratamiento con disolvente/detergente (mezcla de Triton X-100 al 1%, fosfato de tri-n-butilo al 0,3% y polisorbato-80 al 0,3%), nanofiltración (Asahi Planova 35 nm) y almacenamiento a pH bajo (4,7) durante 3 semanas a temperatura elevada.

b. Separación de crioprecipitados

Se descongeló plasma previamente congelado de donantes de sangre, en el que ya se comprobaron las consideraciones de seguridad y calidad, a una temperatura no superior a 6°C. Se realizó centrifugación en frío para separar el sólido y el líquido, que se formó tras la descongelación del plasma. La parte líquida (también denominada "plasma crioempobrecido", tras eliminarse las proteínas insolubles en frío mediante centrifugación a partir de plasma recién descongelado) se enfrió entonces hasta $0 \pm 1^\circ\text{C}$, y se ajustó su pH a 7. Se usó el plasma crioempobrecido para el aislamiento de diversos inhibidores y factores de coagulación en bruto antes del fraccionamiento posterior con alcohol frío. Se eligieron siete rutas para la adsorción discontinua de inhibidores y factores de coagulación en bruto a partir del plasma crioempobrecido antes de la purificación de SUBQ NG 20% y se denominan rutas 1 a 7 en la tabla 3.

Tabla 3. Rutas para la adsorción discontinua de inhibidores y factores de coagulación a partir de plasma crioempobrecido

Etapas	Gel	Heparina	Rutas de adsorción						
			1	2	3	4	5	6	7
Crioprecipitación	-	-	X	X	X	X	X	X	X
FEIBA	0,5 g de DEAE-Sephadex/l	-		X	X				
Factor IX	0,5 g de DEAE-Sephadex/l	2000 UI/ml				X	X	X	X
Factor VII	120 mg de Al(OH) ₃ /l	750 UI/ml						X	X
Antitrombina	1 g de DEAE-Sephadex/l	80000 UI/ml			X		X	X	

Para la producción de SUBQ NG 20% preclínica, se eligieron materiales de partida de Cohn derivados de la ruta 1 (plasma de una fuente estadounidense sin etapas de adsorción), 3 (plasma de una fuente estadounidense tras adsorción de FEIBA, AT-III) y 6 (plasma de una fuente estadounidense tras adsorción de F-IX, FVII, AT-III) para cubrir una amplia variedad de diferentes etapas de adsorción antes del fraccionamiento con alcohol. Se describen diversos procedimientos de adsorción en *Teschner et al.* (2007) *Vox Sang.* 92:42-55; *Polster et al.* (2008) *Vox Sang.* 94:184-192; las patentes estadounidenses n.ºs 6.395.880 y 5.409.990; y Prothrombin complex: Brummelhuis in *Methods of Plasma Protein Fractionation* (J.M. Curling Editor, Academic Press, 1980).

c. Fraccionamiento

i. Obtención de sobrenadante del fraccionamiento I

Mientras estaba agitándose el plasma, se añadió etanol preenfriado, hasta una concentración objetivo de etanol al 8% v/v, y se redujo adicionalmente la temperatura entre -2 y 0°C para permitir la precipitación. Se recogió el sobrenadante (o fraccionamiento I) tras la centrifugación.

ii. Precipitado de los fraccionamientos II y III

Se ajustó el fraccionamiento I a pH 7 y a una concentración de etanol del 20 al 25% v/v, mientras se redujo adicionalmente la temperatura. Posteriormente, se realizó la centrifugación para separar el líquido (sobrenadante del fraccionamiento II + III) y el sólido.

5 iii. Extracción del precipitado de los fraccionamientos II y III

Se usó un tampón de extracción frío (fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM, pH $4,5 \pm 0,2$, conductividad de 0,7 a 0,9 mS/cm) para resuspender los fraccionamientos II + III a una razón de precipitado: tampón de extracción de 1:15. Se realizó el procedimiento de extracción de 2 a 8°C.

10 iv. Tratamiento con sílice pirogénica y filtración

Se añadió sílice pirogénica (por ejemplo, Aerosil 380 o equivalente) a la suspensión hasta una concentración de aproximadamente 40 g/kg de suspensión (o equivalente a 1,8 g/l de plasma crioempobrecido) y se mezcló de 2 a 8°C durante 50 a 70 minutos. Se separaron los líquidos y sólidos mediante filtración de 2 a 8°C usando un agente auxiliar de filtración (Hyflo Super-Cel, World Minerals Inc., 0,5 kg/kg de suspensión), seguido por lavado posterior de la prensa de filtro con tampón de extracción.

20 v. Fraccionamiento del precipitado G

Se mezcló el filtrado con polisorbato-80 hasta una concentración de aproximadamente el 0,2% p/v con agitación durante al menos 30 minutos de 2 a 8°C. Entonces se mezcló citrato de sodio deshidratado en la disolución a 8 g/l durante otros 30 minutos de agitación de 2 a 8°C. Entonces se ajustó el pH a $7,0 \pm 0,1$ con o bien hidróxido de sodio 1 M o bien ácido acético 1 M. Entonces se añadió alcohol frío a la disolución hasta una concentración de aproximadamente el 25% v/v, y se realizó una etapa de precipitación similar a Cohn II (Cohn *et al.* (1946) J. Am. Chem. Soc. 68:459-467).

vi. Suspensión el precipitado G y tratamiento con disolvente/detergente

30 Se disolvió el precipitado y se filtró con un filtro de profundidad de un tamaño de poro nominal de 0,2 μm (por ejemplo, filtro Cuno VR06 o equivalente) para obtener un filtrado transparente que se usó para el tratamiento con disolvente/detergente (S/D).

35 La primera de las etapas en la inactivación viral es tratamiento con S/D del precipitado G resuspendido. La mezcla de tratamiento con S/D contenía Triton X-100 al 1,0% (v/v), Tween-80 al 0,3% (v/v) y fosfato de tri-n-butilo al 0,3% (v/v), y se mantuvo la mezcla de 18 a 25°C durante al menos 60 minutos.

d. Cromatografía de intercambio catiónico

40 Entonces se hizo pasar la disolución de proteína que contenía S/D a través de una columna de intercambio catiónico (Carboximetil (CM)-Sephacrose Fast Flow) para eliminar el disolvente y el detergente. Tras eliminar por lavado los reactivos de S/D, se eluyeron entonces las proteínas absorbidas con tampón de elución de pH alto (pH $8,5 \pm 0,1$).

e. Cromatografía de intercambio aniónico

45 Entonces se ajustó el eluato a pH 6 y se diluyó hasta la conductividad apropiada antes de hacerse pasar la disolución a través de la columna de intercambio aniónico equilibrada (ANX-Sephacrose Fast Flow). Se recogió la fracción no retenida de la columna durante la carga y el lavado para su procesamiento adicional.

50 f. Nanofiltración

En la segunda de las tres etapas de inactivación de virus, se sometió a nanofiltración el efluente de la columna de la última etapa (filtro Asahi Planova de 35 nm) para generar un nanofiltrado.

55 g. Ultrafiltración y diafiltración

Se ajustó la concentración de glicina del nanofiltrado a 0,25 M y se concentró adicionalmente el nanofiltrado hasta una concentración de proteína del $5 \pm 1\%$ p/v mediante ultrafiltración y se ajustó el pH a $5,2 \pm 0,2$. Con el fin de alcanzar una concentración de proteína superior para aplicación subcutánea, se llevó a cabo la ultrafiltración en un casete con un tamiz de canales abiertos y una membrana de ultrafiltración (Millipore Pellicon Biomax) con un punto de corte de peso molecular nominal (NMWCO) de 50 kDa o menos que se diseñó especialmente para productos de alta viscosidad.

65 Se sometió a diafiltración el concentrado frente a una disolución de glicina 0,25 M con un pH de $4,2 \pm 0,2$. El volumen de intercambio mínimo era 10x el volumen de concentrado original. A lo largo de toda la operación de

ultrafiltración/diafiltración, se mantuvo la disolución de 4 a 20°C. Tras la diafiltración, se concentró la disolución hasta una concentración de proteína del 22% p/v como mínimo y se ajustó de 2 a 8°C.

Con el fin de recuperar la proteína residual completa en el sistema, aumentando de ese modo la concentración de proteína, se realizó un lavado posterior del primer sistema de ultrafiltración más grande con al menos 2x el volumen muerto en modo de recirculación para garantizar que se retiraba por lavado toda la proteína. Entonces se concentró el lavado posterior del primer sistema de ultrafiltración hasta una concentración de proteína de al menos el 22% p/v con un segundo sistema de ultra-/diafiltración equipado con el mismo tipo de membrana que se dimensionó a una décima o menos de la primera. Se añadió el concentrado del lavado posterior a la disolución a granel. Entonces se sometió a lavado posterior el segundo sistema de ultrafiltración y se ajustó la temperatura de la disolución de 2 a 8°C.

h. Formulación

Para la formulación, se ajustó la concentración de proteína de la disolución al $20,4 \pm 0,4\%$ p/v con lavado posterior del segundo sistema de ultrafiltración más pequeño y/o con tampón de diafiltración. Se ajustó el pH de 4,4 a 4,9, si era necesario.

i. Esterilización adicional

Se esterilizó adicionalmente la disolución a granel formulada filtrando en primer lugar a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro absoluto de 0,2 micrómetros o menos, entonces se dispuso de manera aséptica en recipientes finales para su sellado apropiado, tomándose muestras para las pruebas. Se realizó la etapa de inactivación/eliminación de virus final almacenando los recipientes sellados de 30 a 32°C durante 21 a 22 días.

Por tanto, las formulaciones del 20% de IG resultantes eran formulaciones líquidas altamente purificadas, isotónicas de inmunoglobulina (al menos el 95% de gammaglobulina) formuladas en glicina 0,25 mM a pH de 4,4 a 4,9. Las preparaciones finales usadas en los estudios fueron los lotes SC00107NG, SC00207NG y SC00307NG.

B. Caracterización de lotes preclínicos

Se fabricaron los lotes preclínicos SC00107NG, SC00207NG y SC00307NG en la escala de 200 l y se caracterizaron según la tabla 4. Al nivel a granel final, se ilustró la pureza de la preparación mediante los bajos niveles de las impurezas principales, que estaban muy por debajo del 0,1% de la IgG total. La distribución de tamaño molecular (MSD) en el producto del 20% de IG en la fase final del procedimiento era similar a la MSD de un recipiente final del 10% de IG (Gammagard Liquid). Esto indicó que el aumento de la concentración hasta el 20% de proteína no tuvo un impacto negativo sobre la integridad de la molécula de IgG.

Tabla 4. Caracterización de lotes de SUBQ NG 20%

Prueba / método	Lote	A granel estéril		
		SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG
Proteína total / UV	g/l de plasma	3,4	3,7	3,7
IgG / nefelométrico	g/l de plasma	3,0	3,0	3,0
IgA / ELISA	g/l de plasma	<0,001	<0,001	<0,001
IgM / ELISA	g/l de plasma	<0,001	<0,001	<0,001
MSD (HPLC)	% de agregados	0,1	0,1	0,1
	% de oligo/dímeros	4,6	4,5	3,2
	% de monómeros	95,2	95,4	96,6
	% de fragmentos	0,1	0	0,1
Número de lote del material de partida		Precipitado G VNELG171	Precipitado G VNELG173	Precipitado G LB0790301

Los criterios de liberación de recipientes finales preliminares se definieron basándose en los requisitos de las autoridades estadounidenses y europeas (FDA y EMEA) para inmunoglobulinas humanas subcutáneas, las especificaciones del recipiente final del producto actual para administración subcutánea (SUBCUVIA, autorizado para administración subcutánea en Europa) y las especificaciones de Gammagard Liquid. Se completó la caracterización del espectro de anticuerpos relevante de los tres recipientes finales y se comparó con los resultados de los lotes triplemente reducidos en virus (TVR) del 10% de IG preclínicos. La tabla 5 compara los resultados de los títulos de anticuerpo y los factores de enriquecimiento de los tres recipientes finales de SUBQ NG 20% preclínicos y los lotes de Gammagard Liquid preclínicos. Los resultados están en el mismo orden de magnitud para ambos lotes.

Tabla 5. Comparación de los datos de liberación de SUBQ NG 20% y el 10% de IG TVR

	SUBQ NG 20 %	10 % IG TVR
--	--------------	-------------

			SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG	P00101G 01C21AN11	P00201NG 01C21AN21	P00301NG 01D05AN11
	Sistema de prueba	Unidad						
Bacterias:								
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> EUR	Cobayas	UI/ml	6,0	6,0	6,0	5,0	5,0	5,0
Virus								
VHA	ELISA	UI/ml	14,0	14,0	27,0	14	9	16
VHB (anticuerpos frente a Ag de hep B)	ELISA	IU/mg de TP	40,0	47,0	43,0	35,9	40,1	40,0
Factor de enri. de virus del sarampión EUR	Hemaglut.		41,0	41,0	24,0	n/a	n/a	n/a
Virus del sarampión EE.UU.	Hemaglut.	NIH 176	0,8	0,8	0	1,001	1,0	1,001
Parvo 619	ELISA	UI/ml	718	78	71	567	442	36
Virus de poliomielitis virus tipo I		N1H U/ml	1,4	1,711	1,5	1,01	1,11	1,21

Se realizaron pruebas de control de calidad adicionales para evaluar el nivel de producto y/o impurezas relacionadas con el procedimiento. La tabla 6 muestra los datos de control de calidad de los tres recipientes finales de SUBQ NG 20%. La eliminación de impurezas relacionadas con el procedimiento y producto es satisfactoria, y se cumplen todas las especificaciones preliminares relacionadas con el producto para los tres lotes.

5

Tabla 6. Pruebas de control de calidad del recipiente final de SUBQ NG 20%

			SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG
	Sistema de prueba	Unidad			
Integridad funcional de Fc	Unión a Bc-binding	% de BPR del lote 3	15,8	138	164
Actividad anticomplementaria	Método de EP	%	41,1	41,5	41,2
Actividad anticomplementaria	Método de EP	CH50 U/mg	41,4	41,8	41,6
Actividad de activador de precalicreína, EUR	cromogénico	UI/ml	<0,6	1,004	1,237
Hemaglutininas anti-A, pH. Eur.	hemaglut.	Dilución: 1	8	16	8
Hemaglutininas anti-B, pH. Eur.	hemaglut.	Dilución: 1	4	4	2
Anti-D	hemaglut.		cumple	cumple	cumple
Exclusión de pirogenicidad, pH. Eur. y CFR	conejo	Elevación de °C	libre de pirógenos	libre de pirógenos	libre de pirógenos
Endotoxinas bacterianas Pureza mediante electroforesis en acetato de celulosa	CAE cromogénico	UI/ml %	<1,2 99,6	1,8 99,8	<1,2 99,5
Distribución de tamaño molecular (monómero + dímeros)	SE-HPLC	%	99,2	99,3	99,2
Distribución de tamaño molecular (polímeros)	SE-HPLC	%	0,2	0,2	0,3
Distribución de tamaño molecular (fragmentos)	SE-HPLC	%	0,6	0,5	0,5
IgA - EUR	ELISA	µg/ml	20	20	30

IgM	ELISA	µg/ml	1,1	1,0	1,2
IgG	Nefelometría	mg/ml	177	165	163
Proteína (a granel)	UV	mg/ml	201	203	202
Proteína	Autom.N2	mg/ml	202	208	203
Glicina	HPLC	mg/ml	14,7	14,5	14,7
Polisorbato 80	Espectrofot.	µg/ml	<250	<250	<250
TNBP	Cromat. de gases	µg/ml	<0,3	<0,3	<0,3
Octoxinol 9	Cromat. iónica	µg/ml	<3	<3	<3
Esterilidad	Filtr. por membrana	n/a	estéril	estéril	estéril
Osmolalidad		mOsmol/kg	298	298	299
pH, no diluido	Potenciaometría		5,1	5,2	5,3
Aspecto	Inspec. visual		satisfactorio	satisfactorio	satisfactorio
Etanol	Cromat. de gases	µg/ml	<20	<20	<20
Isopropanol	Cromat. de gases	µg/ml	<20	<20	<20
AAS de aluminio	Fotometría	µg/l	<50	<50	<50
ICP OES de silicio	Electr. iónica	µg/l	3466	17270	21180
Heparina		UI/ml	<0,0075	<0,0075	<0,0075

Los parámetros monitorizados en procedimiento durante la producción preclínica y la caracterización de productos intermedios y el producto final mostraron que no había diferencias obvias detectables entre los tres lotes. Todos los recipientes finales cumplieron las especificaciones preliminares relacionadas con el producto independientemente de la clase de material de partida que (precipitado G VNELG171, VNELG173 o LB0790301) se eligió.

C. Estudio de almacenamiento de formulaciones del 20% de IG

Con el fin de evaluar la estabilidad en almacenamiento de los recipientes finales del 20% de IG, se almacenaron los 3 lotes preclínicos descritos anteriormente (SC00107NG, SC00207NG, SC00307NG) y un lote de viabilidad (IgGSC 62/1) de 2 a 8°C y de 28 a 30°C (lote de viabilidad sólo) hasta 18 meses. Se usó cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento para determinar la distribución de tamaño molecular (MSD) y la estabilidad de las muestras. El principal parámetro que indica estabilidad es el tamaño molecular, y un cambio en el tamaño puede ser el resultado de degradación por desnaturalización, agregación o fragmentación.

En la tabla 7 se muestra la MSD de los recipientes finales preclínicos tras almacenamiento de 2 a 8°C hasta 12 meses. La tabla 8 proporciona la MSD del lote de viabilidad, IgGSC 62/1, de 2 a 8°C y de 28 a 30°C, tras almacenamiento hasta 18 meses. Los datos confirmaron que el producto cumple las especificaciones definidas anteriormente para los parámetros investigados durante hasta 18 meses de almacenamiento de 2 a 8°C y de 28 a 30°C.

Tabla 7. MSD de lotes del 20% de IG preclínicos de 2 a 8°C

Lote	Mes	MSD (HP-SEC) (%)		
		Agregados (>450 KDa)	Olig/dímeros + monómeros	Fragmentos (<70Kda)
SC00107NG	0	0,3	99,5	0,2
	3	0,4	99,5	0,2
	4	0,5	99,4	0,2
	6	0,5	99,3	0,2
	12	0,7	99,1	0,3
SC00207NG	0	0,3	99,5	0,2
	3	0,4	99,5	0,1
	4	0,5	99,3	0,2
	6	0,6	99,2	0,2
	12	0,8	99,0	0,2
SC00307NG	0	0,3	99,6	0,1
	3	0,5	99,3	0,2
	4	0,6	99,2	0,1
	6	0,7	99,1	0,2
	12	0,9	98,8	0,2
Criterios de liberación		<5	>90	<5

Tabla 8. MSD del lote de viabilidad IgGSC 62/1 de 2 a 8°C y de 28 a 30°C

	MSD (HP-SEC) (%)
--	------------------

Lote	°C	Mes	Agregados (>450 KDa)	Olig/dímeros + monómeros	Fragmentos (<70Kda)
IgGSC 62/1	de 2 a 8	0	0,2	99,5	0,3
		1	0,1	99,7	0,2
		3	0,2	99,6	0,2
		6	0,3	99,4	0,3
		12	0,4	99,3	0,3
		18	0,4	99,2	0,4
	de 28 a 30	0	0,2	99,5	0,3
		1	0,2	99,2	0,6
		3	0,3	98,7	1,0
		6	0,6	98,0	1,4
		12	1,2	95,6	3,2
		18	1,9	93,5	3,8
Criterios de liberación			<5	>90	<5

D. Estudio de estabilidad de diversas formulaciones y concentraciones de IG

Se comparó la estabilidad en almacenamiento de formulaciones de alta concentración de proteína (del 14-20%) con bajo pH (glicina 0,25 M pH 4,4 - 4,9) con formulaciones de alta concentración de proteína con pH neutro (glicina 22,5 g/l, NaCl 3 g/l, pH 7,0), que se usan para inmunoglobulinas inyectables por vía subcutánea y por vía intramuscular.

Todas las ejecuciones comenzaron con la concentración del nanofiltrado hasta el 5% de proteína. Se realizó un intercambio de tampón 10x frente a glicina 0,15 M (la menor concentración de glicina investigada), seguido por la concentración final hasta un valor objetivo por encima del 20% de proteína usando una membrana de polietersulfona de 0,5 m² de Millipore con un corte molecular de 30 K (tamiz convencional). Los recipientes finales o bien se formularon y almacenaron a pH bajo (4,7) o bien el almacenamiento a pH bajo se realizó a granel y después de eso se formularon a pH neutro (7,0) antes del almacenamiento a o bien de 2 a 8°C o bien de 28 a 30°C durante 3 meses. Tras 3 meses, se determinó la distribución de tamaño molecular mediante cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento con el fin de determinar el contenido en agregados y fragmentos. Se definieron criterios de aceptación como: monómeros y oligo-/dímeros, ≥ 90%; agregados, ≤ 5%, fragmentos, ≤ 5%. Se sometió a prueba el título de ACA tal como se describe en la Farmacopea Europea. Se definió un título de ACA aceptable como menos del 50% de unidades de CH₅₀ consumidas por mg de proteína.

Las tablas 9 y 10 muestran el contenido en agregados y fragmentos así como el título de ACA tras 3 meses de almacenamiento a de 28 a 30°C y de 2 a 8°C, respectivamente, para las formulaciones convencionales (pH 4,7, glicina 0,25 M; o pH 7,0, glicina 22,5 g/l, NaCl 3 g/l) a diferentes concentraciones de proteína. Los datos muestran claramente que la formulación de pH bajo tenía menos agregados y un título de ACA inferior tras 3 meses de almacenamiento a de 28 a 30°C. Todos los títulos de ACA de las formulaciones de pH 7,0 estaban por encima del criterio de aceptación definido para esta prueba.

Los resultados a de 2 a 8°C confirman la tendencia observada a de 28 a 30°C. Los títulos de ACA estaban todos por debajo del límite definido como criterio de aceptación, aunque las formulaciones de pH 7,0 parecían tener valores superiores. El valor de proteína no influye en los resultados de los parámetros sometidos a prueba.

Tabla 9. Valores de fragmentos, agregados y ACA tras 3 meses de almacenamiento a de 28 a 30°C a pH 4,7 y pH 7,0 a diferentes concentraciones de proteína

Proteína	Fragmentos, %		Agregados, %		Título de ACA, %	
	pH 4,7	pH 7,0	pH 4,7	pH 7,0	pH 4,7	pH 7,0
14%	1,35	1,50	0,10	0,92	44,1	52,0
16%	1,24	1,38	0,08	0,91	40,5	53,1
18%	1,24	1,60	0,11	0,93	40,3	52,4
20%	1,35	1,52	0,12	0,93	37,5	62,7

Tabla 10. Valores de fragmentos, agregados y ACA tras 3 meses de almacenamiento a de 2 a 8°C a pH 4,7 y pH 7,0 a diferentes concentraciones de proteína

Proteína	Fragmentos, %		Agregados, %		Título de ACA, %	
	pH 4,7	pH 7,0	pH 4,7	pH 7,0	pH 4,7	pH 7,0
14%	0,36	1,80	0,16	1,09	38,3	46,5
16%	0,30	0,51	0,11	1,01	37,4	44,7

18%	0,33	1,10	0,17	0,86	35,8	39,8
20%	0,33	1,98	0,20	1,06	36,1	46,0

Se investigó la influencia de diferentes procedimientos de concentración sobre la MSD y el título de ACA. El primer procedimiento usó una membrana de polietersulfona de 0,5 m² de Millipore con un corte molecular de 30 K (tamiz convencional), tal como se describió anteriormente, y el segundo procedimiento usó una membrana de polietersulfona de 0,5 m² de Millipore con un tamiz abierto, adecuado para disoluciones con mayor viscosidad. Se concentraron las fracciones del lavado posterior mediante un segundo dispositivo de ultra-/diafiltración con una superficie de membrana inferior (0,1 m², tamiz abierto) con el fin de reducir las pérdidas de rendimiento.

Las tablas 11 y 12 muestran la MSD y el título de ACA tras 3 meses de almacenamiento a de 28 a 30°C o de 2 a 8°C, respectivamente, para las formulaciones de pH bajo (4,7) a diversas concentraciones de proteína. Los datos mostraron resultados similares tras 3 meses de almacenamiento para ambos modos de concentración. Los valores obtenidos a de 2 a 8°C confirmaron los resultados obtenidos a de 28 a 30°C. El método de concentración no influye en la estabilidad del producto, aunque un lavado posterior adecuado sólo puede obtenerse con membranas de tamiz abierto.

Tabla 11. Valores de fragmentos, agregados y ACA tras 3 meses de almacenamiento a de 28 a 30°C a pH 4,7 con diferentes métodos de concentración de proteína

Proteína	Fragmentos (%)		Agregados (%)		Título de ACA	
	tamiz convencional	tamiz abierto	tamiz convencional	tamiz abierto	tamiz convencional	tamiz abierto
14%	1,35	0,92	0,10	0,21	44,1	42,6
16%	1,24	1,09	0,08	0,20	40,5	40,9
18%	1,24	0,96	0,11	0,23	40,3	40,7
20%	1,35	0,98	0,12	0,30	37,5	41,6

Tabla 12. Valores de fragmentos, agregados y ACA tras 3 meses de almacenamiento a de 2 a 8°C a pH 4,7 con diferentes métodos de concentración de proteína

Proteína	Fragmentos (%)		Agregados (%)		Título de ACA (%)	
	tamiz convencional	tamiz abierto	tamiz convencional	tamiz abierto	tamiz convencional	tamiz abierto
14%	0,36	0,27	0,16	0,17	38,3	39,6
16%	0,30	0,22	0,11	0,14	37,4	38,3
18%	0,33	0,23	0,17	0,18	35,8	39,6
20%	0,33	0,22	0,20	0,20	36,1	39,9

Ejemplo 3

Preparación de PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20)

A. Generación de una línea celular que expresa rHuPH20 soluble

Se usó el plásmido HZ24 (expuesto en SEQ ID NO: 52) para transfectar células de ovario de hámster chino (células CHO) (véanse por ejemplo las solicitudes n.ºs 10.795.095, 11/065.716 y 11/238.171). El vector de plásmido HZ24 para la expresión de rHuPH20 soluble contiene una estructura principal de vector pCI (Promega), ADN que codifica para los aminoácidos 1-482 de hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO: 110), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón. La estructura principal de vector pCI incluye también ADN que codifica para el gen de resistencia a Beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación f1, una región potenciadora/promotora temprana inmediata de citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico, y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica para el constructo de rHuPH20 soluble contiene un sitio NheI y una secuencia consenso Kozak antes del ADN que codifica para la metionina en la posición de aminoácido 1 de la secuencia señal de 35 aminoácidos nativa de PH20 humana, y un codón de terminación tras el ADN que codifica para la tirosina correspondiente a la posición de aminoácido 482 de la hialuronidasa PH20 humana (expuesta en SEQ ID NO: 1), seguido por un sitio de restricción BamHI. El constructo pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por tanto, da como resultado una única especie de ARNm dirigida por el promotor de CMV que codifica para los aminoácidos 1-482 de PH20 humana (expuesta en SEQ ID NO: 3 y los aminoácidos 1-186 de dihidrofolato reductasa de ratón (expuesta en SEQ ID NO: 53), separado por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

Se sembraron células DG44 CHO no transfectadas en medio CD-CHO modificado de GIBCO para células DHFR(-), complementado con glutamina 4 mM y Plurionic F68/L 18 ml/l (Gibco), a 0,5 x 10⁶ células/ml en un frasco agitador en la preparación para la transfección. Se hicieron crecer las células a 37°C en el 5% de CO₂ en un incubador

humidificado, agitando a 120 rpm. Se sometieron a prueba células DG44 CHO no transfectadas que crecían exponencialmente antes de la transfección.

Se sedimentaron sesenta millones de células viables del cultivo de células DG44 CHO no transfectadas y se resuspendieron hasta una densidad de 2×10^7 células en 0,7 ml de tampón de transfección 2x (2x HeBS: Hepes 40 mM, pH 7,0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na_2HPO_4 1,4 mM, dextrosa 12 mM). A cada alícuota de células resuspendidas, se le añadieron 0,09 ml (250 μg) del plásmido HZ24 lineal (linealizado mediante digestión durante la noche con Cla I (New England Biolabs), y se transfirieron las disoluciones de células/ADN a cubetas de electroporación BTX (Gentronics) de 0,4 cm de hueco a temperatura ambiente. Se realizó una electroporación control negativo sin ADN de plásmido mezclado con las células. Se sometieron a electroporación las mezclas de células/plásmidos con una descarga de capacitador de 330 V y 960 μF o a 350 V y 960 μF .

Se retiraron las células de las cubetas tras la electroporación y se transfirieron a 5 ml de medio CD-CHO modificado para células DHFR(-), complementado con glutamina 4 mM y Plurionic F68/L 18 ml/l (Gibco), y se permitió que crecieran en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos sin selección durante 2 días a 37°C en el 5% de CO_2 en un incubador humidificado.

Dos días tras la electroporación, se retiraron 0,5 ml de medio de cultivo tisular de cada pocillo y se sometió a prueba para detectar la presencia de actividad hialuronidasa, usando el ensayo de microturbidez descrito en el ejemplo 4.

Tabla 13. Actividad hialuronidasa inicial de células DG44 CHO transfectadas a las 40 horas tras la transfección

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

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

Se identificaron diez clones de las 5 placas hechos crecer sin metotrexato.

Tabla 14. Actividad hialuronidasa de clones identificados

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

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

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

B. Producción y purificación de PH20 humana Gen1

a. Procedimiento en biorreactor de 5 l

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

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

rHuPH20 soluble se unió a Q Sepharose y se eluyó a NaCl 400 mM en el mismo tampón. Se diluyó el eluato con sulfato de amonio 2 M hasta una concentración final de sulfato de amonio 500 mM y se hizo pasar a través de una columna de Phenyl Sepharose (Low Sub), seguido por unión en las mismas condiciones a una resina de boronato de fenilo. Se eluyó la rHuPH20 soluble de la resina de Phenyl Sepharose en Hepes pH 6,9 tras lavar a pH 9,0 en bicina 50 mM sin sulfato de amonio. Se cargó el eluato sobre una resina de hidroxipatita cerámica a pH 6,9 en fosfato de potasio 5 mM y CaCl_2 1 mM y se eluyó con fosfato de potasio 80 mM, pH 7,4 con CaCl_2 0,1 mM.

La rHuPH20 soluble purificada resultante presentaba una actividad específica en exceso de 65.000 unidades USP/mg de proteína por medio del ensayo de microturbidez (ejemplo 4) usando el patrón de referencia de la USP. rHuPH20 soluble purificada se eluyó como un único pico desde 24 hasta 26 minutos a partir de una columna de estireno-divinilbenceno 5RPC de Pharmacia con un gradiente entre TFA al 0,1%/H₂O y TFA al 0,1%/90% de acetonitrilo/10% de H₂O y se resolvió como una única banda de 61 kDa ancha mediante electroforesis en SDS que se redujo hasta una banda de 51 kDa estrecha tras el tratamiento con PNGase-F. La secuenciación de aminoácidos N-terminales reveló que el péptido líder se había eliminado eficazmente.

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

Se usó un procedimiento de aumento de escala para purificar por separado rHuPH20 soluble de cuatro viales diferentes de células 3D35M para producir 4 lotes separados de rHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C. Cada vial se expandió por separado y se cultivó a través de un biorreactor de 125 l, luego se purificó usando cromatografía en columna. Se tomaron muestras a lo largo de todo el procedimiento para evaluar parámetros tales como rendimiento enzimático. La descripción del procedimiento proporcionada a continuación expone especificaciones representativas para cosas tales como volúmenes de medios de alimentación e iniciación del biorreactor, densidades celulares de transferencia y volúmenes de elución y lavado. Los numerosos exactos varían ligeramente con cada lote, y se detallan en las tablas 15 a 22.

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

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

verificación del pH, el análisis del medio, la producción y retención de proteína. Se añadieron alimentaciones de nutrientes durante la ejecución. En el día 6, se añadieron 3,4 l de medio de alimentación n.º 1 (CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX™-1 40 ml/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 36,5°C. En el día 9, se añadieron 3,5 l de alimentación n.º 2 (CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX™-1 40 ml/l + butirato de sodio 1,1 g/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 36°C. En el día 11, se añadieron 3,7 l de alimentación n.º 3 (CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX™-1 40 ml/l + butirato de sodio 1,1 g/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 35,5°C. Se cosechó el reactor a los 14 días o cuando la viabilidad de las células descendió por debajo del 50%. El procedimiento dio como resultado la producción de rHuPH20 soluble con una actividad enzimática de 1600 unidades/ml con una densidad celular máxima de 8 millones de células/ml. En la cosecha, se tomaron muestras del cultivo para la detección de micoplasmas, carga biológica, endotoxinas y virus *in vitro* e *in vivo*, microscopía electrónica de transmisión (TEM) para detectar partículas virales, y actividad enzimática.

Se filtró la cosecha de cultivo celular de biorreactor de 100 l a través de una serie de filtros de cápsulas desechables que tenían un medio de polietersulfona (Sartorius): en primer lugar a través de una cápsula de 8,0 µm de profundidad, una cápsula de 0,65 µm de profundidad, una cápsula de 0,22 µm, y finalmente a través de un filtro de 2000 cm² de Sartopore de 0,22 µm y dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 100 l. Se concentró el cultivo 10x usando dos filtros de MWCO de 30 kDa de TFF con polietersulfona espiral (Millipore), seguido por un intercambio de tampón 6x con HEPES 10 mM, Na₂SO₄ 25 mM, pH 7,0 en un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. La tabla 15 proporciona datos de monitorización relacionados con las etapas de cultivo celular, cosecha, concentración e intercambio de tampón.

Tabla 15. Datos de monitorización para las etapas de cultivo celular, cosecha, concentración e intercambio de tampón.

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

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

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

Se cargó la proteína purificada en PS sobre una columna de boronato de aminofenilo (ProMedics) (6,3 l de resina, altura = 20 cm, diámetro = 20 cm) que se había equilibrado con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. Se hizo pasar la proteína a través de la columna a una velocidad de flujo de 100 cm/h, y se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. Entonces se lavó la columna con bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0 y se eluyó la proteína con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM pH 6,9 a través de un filtro estéril y dentro de una bolsa estéril de 20 l. Se sometió a prueba el eluato para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Se equilibró una columna de hidroxiapatita (HAP) (Bio-Rad) (1,6 l de resina, altura = 10 cm, diámetro = 14 cm) con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM pH 7,0. Se recogieron muestras de lavado y se sometieron a prueba para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). Se complementó la proteína purificada en boronato de aminofenilo con fosfato de potasio y CaCl_2 para producir concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y CaCl_2 0,1 mM y se cargó sobre la columna de HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM, luego fosfato de potasio 10 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM pH. Se eluyó la proteína con fosfato de potasio 70 mM pH 7,0 y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm dentro de una bolsa estéril de 5 l. Se sometió a prueba el eluato para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

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

Las tablas 16 a 22 proporcionan datos de monitorización relacionados con cada una de las etapas de purificación descritas anteriormente, para cada lote de células 3D35M.

Tabla 16. Datos de columna de Q sepharose

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

Tabla 17. Datos de columna de Phenyl Sepharose

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

Tabla 18. Datos de columna de boronato de aminofenilo

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
-----------	----------	----------	----------	----------

Volumen de carga (ml)	16136	17958	16931	17884
Razón de volumen de carga/volumen de resina	2,99	3,15	3,08	2,98
Volumen de columna (ml)	5400	5700	5500	5300
Volumen de eluato (ml)	17595	22084	20686	19145
Conc. de proteína del eluato (mg/ml)	0,0	0,03	0,03	0,04
Conc. de proteína del eluato filtrado (mg/ml)	no sometido a prueba	0,03	0,00	0,04
Ensayo enzimático del eluato (U/ml)	4050	2410	1523	4721
Rendimiento de proteína (%)	0	11	11	12
Rendimiento enzimático (%)	no determinado	41	40	69

Tabla 19. Datos de columna de hidroxipatita

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

5 Tabla 20. Datos de filtración de DV20

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

Tabla 21. Datos de concentración final

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

10

Tabla 22. Datos del intercambio de tampón para dar la formulación final

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

15

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

20

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

Se adaptó la línea celular 3D35M Gen1 descrita anteriormente a niveles de metotrexato superiores para producir clones de generación 2 (Gen2). Se sembraron células 3D35M a partir de cultivos que contenían metotrexato establecidos en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 1,0 µM. Se adaptaron las células a un nivel de metotrexato superior haciéndolas crecer y pasándolas 9 veces a lo largo de un periodo de 46 días en un incubador humidificado a 37°C, el 7% de CO₂. Se clonó la población de células amplificada mediante dilución limitante en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían medio con metotrexato 2,0 µM. Tras aproximadamente 4 semanas, se identificaron los clones y se seleccionó el clon 3E10B para la expansión. Se hicieron crecer células 3E10B en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 2,0 µM durante 20 pases. Se creó un banco de células maestras (MCB) de la línea celular 3E10B y se congeló y usó para estudios posteriores.

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

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

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

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

Se esterilizó un reactor de 400 l y se añadieron 230 ml de medio CD-CHO. Antes de su uso, se comprobó si el reactor presentaba contaminación. Se transfirieron aproximadamente 30 l de células de los frascos centrifugadores de 36 l al biorreactor de 400 l (Braun) a una densidad de inoculación de $4,0 \times 10^5$ células viables por ml y un volumen total de 260 l. Los parámetros fueron punto de ajuste de temperatura: 37°C; velocidad del impulsor 40-55 rpm; presión del recipiente: 3 psi; rociado de aire: 0,5-1,5 l/min; recubrimiento de aire: 3 l/min. Se tomaron muestras del reactor diariamente para los recuentos celulares, la verificación del pH, el análisis del medio, la producción y retención de proteína. Además, durante la ejecución se añadieron alimentaciones de nutrientes. A las 120 h (día 5), se añadieron 10,4 l de medio de alimentación n.º 1 (4x CD-CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 160 ml/l + Yeastolate 83 ml/l + insulina humana recombinante 33 mg/l). A las 168 horas (día 7), se añadieron 10,8 l de alimentación n.º 2 (2x CD-CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 80 ml/l + Yeastolate 167 ml/l + butirato de sodio 0,92 g/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 36,5°C. A las 216 horas (día 9), se añadieron 10,8 l de alimentación n.º 3 (1x CD-CHO + glucosa 50 g/l + Glutamax-1™ 50 ml/l + Yeastolate 250 ml/l + butirato de sodio 1,80 g/l), y se

cambió la temperatura de cultivo a 36° C. A las 264 horas (día 11), se añadieron 10,8 l de alimentación n.º 4 (1x CD-CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax-1™ 33 ml/l + Yeastolate 250 ml/l + butirato de sodio 0,92 g/l), y se cambió la temperatura de cultivo a 35,5°C. Se observó que la adición de los medios de alimentación potenciaba drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en las fases de producción finales. Se cosechó el reactor a los 14 ó 15 días o cuando la viabilidad de las células descendió por debajo del 40%. El procedimiento dio como resultado una productividad final de 17.000 unidades por ml con una densidad celular máxima de 12 millones de células/ml. En la cosecha, se tomaron muestras del cultivo para detectar micoplasmas, carga biológica, endotoxinas y virus *in vitro* e *in vivo*, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y actividad enzimática.

Se bombeó el cultivo mediante una bomba peristáltica a través de cuatro módulos del sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, conteniendo cada uno una capa de tierra de diatomeas graduada hasta 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada hasta 1,4-1,1 µm, seguido por una membrana de celulosa, luego a través de un segundo sistema de filtración Millistak individual (Millipore) que contenía una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm, seguido por una membrana de celulosa, y luego a través de un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa flexible de uso único estéril con una capacidad de 350 l. Se complementó el fluido de cultivo celular cosechado con EDTA 10 mM y Tris 10 mM hasta un pH de 7,5. Se concentró el cultivo 10x con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) usando cuatro filtros de polietersulfona (PES) (Sartorius) con un punto de corte de peso molecular (MWCO) de 30 kDa Sartoslice TFF, seguido por un intercambio de tampón 10x con Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20mM, pH 7,5 en un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 50 l.

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

E. Purificación de rHuPH20 soluble Gen2

Se preparó una columna de intercambio iónico de Q Sepharose (Pharmacia) (9 l de resina, H= 29 cm, D= 20 cm). Se recogieron muestras de lavado para la determinación del pH, la conductividad y el ensayo de endotoxinas (LAL). Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. Tras la inactivación viral, se cargó la cosecha concentrada, diafiltrada sobre la columna Q a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. Se eluyó la proteína con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 en un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril. Se sometió a prueba la muestra de eluato para determinar la carga biológica, concentración de proteína y actividad hialuronidasa. Se tomaron lecturas de absorbancia de A₂₈₀ al comienzo y al final del intercambio.

A continuación se realizó cromatografía de interacción hidrófoba de Phenil-Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna de phenyl sepharose (PS) (19-21 l de resina, H=29 cm, D= 30 cm). Se recogió el lavado y se tomaron muestras para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. Se complementó el eluato de proteína de la columna de Q sepharose con disoluciones madre de sulfato de amonio 2 M, fosfato de potasio 1 M y CaCl₂ 1 M para producir concentraciones finales de 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. Se cargó la proteína sobre la columna de PS a una velocidad de flujo de 100 cm/h y se recogió la fracción no retenida de la columna. Se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 mM pH 7,0 a 100 cm/h y se añadió el lavado a la fracción no retenida recogida. Combinado con el lavado de la columna, se hizo pasar la fracción no retenida a través de un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril. Se tomaron muestras de la fracción no retenida para determinar la carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

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

Se preparó la columna de hidroxipatita (HAP) (Bio-rad). Se recogió el lavado y se sometió a prueba para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). Se equilibró la columna con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. Se complementó la proteína purificada en boronato de aminofenilo hasta concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y CaCl₂ 0,1 mM y se cargó sobre la columna de HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl₂

0,1 mM. A continuación se lavó la columna con fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. Se eluyó la proteína con fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 y se hizo pasar a través de un filtro estéril de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril. Se sometió a prueba la muestra eluida para determinar la carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

Entonces se hizo pasar la proteína purificada en HAP a través de un filtro de eliminación de virus. Se preparó el filtro Viosart esterilizado (Sartorius) en primer lugar lavando con 2 l de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0. Antes de su uso, se tomaron muestras del tampón filtrado para determinar el pH y la conductividad. Se bombeó la proteína purificada en HAP por medio de una bomba peristáltica a través del filtro de eliminación de virus 20 nM. Se hizo pasar la proteína filtrada en fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 a través de un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril. Se sometió a prueba la muestra con virus filtrados para determinar la concentración de proteína, actividad enzimática, perfil de oligosacáridos, monosacáridos y ácidos siálicos. También se sometió a prueba la muestra para determinar impurezas relacionadas con el procedimiento.

Entonces se concentró la proteína en el filtrado hasta 10 mg/ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) (Sartorius) de punto de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD Sartocon Slice. Se preparó el filtro en primer lugar lavando con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0 y se tomaron muestras del permeado para determinar el pH y la conductividad. Tras la concentración, se tomaron muestras de la proteína concentrada y se sometieron a prueba para determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática. Se realiza un intercambio de tampón 6x sobre la proteína concentrada en el tampón final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0. Tras el intercambio de tampón, se hizo pasar la proteína concentrada a través de un filtro de 0,22 µm dentro de una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. Se tomaron muestras de la proteína y se sometieron a prueba para determinar la concentración de proteína, la actividad enzimática, los grupos sulfhidrilo libres, el perfil de oligosacáridos y la osmolaridad.

Entonces se dispensó de manera estéril la proteína a granel filtrada estéril a 20 ml en viales de teflón estériles de 30 ml (Nalgene). Entonces se congelaron instantáneamente los viales y se almacenaron a -20 ± 5°C.

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

La producción y purificación de rHuPH20 soluble Gen2 en un cultivo celular en biorreactor de 300 l contenía algunos cambios en los protocolos en comparación con la producción y purificación rHuPH20 soluble Gen1 en un cultivo celular en biorreactor de 100 l. La tabla 23 expone diferencias a modo de ejemplo, además de cambios de aumento a escala sencillos, entre los métodos.

Tabla 23. Comparación de los métodos de Gen1 y Gen2

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

	glucosa 50 g/l + GlutaMAX 8 mM + butirato de sodio 1,1 g/l Alimentación n.º 3: CD CHO + glucosa 50 g/l + GlutaMAX 8 mM + butirato de sodio 1,1 g/l	Alimentación n.º 2: 2x CD CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax 16 mM + Yeastolate 33,4 g/l + butirato de sodio 0,92 g/l Alimentación n.º 3: 1x CD CHO + glucosa 50 g/l + Glutamax 10 mM + Yeastolate 50 g/l + butirato de sodio 1,80 g/l Alimentación n.º 4: 1x CD CHO + glucosa 33 g/l + Glutamax 6,6 mM + Yeastolate 50 g/l + butirato de sodio 0,92 g/l
Filtración de cultivo celular en biorreactor	Cuatro filtros de polietersulfona (8,0 µm, 0,65 µm, 0,22 µm y 0,22 µm) en serie Bolsa de almacenamiento de 100 l	1ª fase - Cuatro módulos en paralelo, cada uno con una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 2ª fase – Módulo individual que contiene una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 3ª fase – Filtro de polietersulfona de 0,22 µm Bolsa de almacenamiento de 300 l El cultivo celular recogido se complementa con EDTA 10 mM, Tris 10 mM a un pH de 7,5
Concentración e intercambio de tampón antes de la cromatografía	Concentrado con 2 TFF con filtro de MWCO de 30 K de polietersulfona Millipore Spiral Intercambio de tampón del concentrado 6x con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0 Bolsa de almacenamiento estéril de 20 l	Concentrado usando cuatro filtros de MWCO de 30 K Sartorius Sartoslice TFF Intercambio de tampón del concentrado 10x con Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 Bolsa de almacenamiento estéril de 50 l
Inactivación viral antes de la cromatografía	Ninguna	Inactivación viral realizada con la adición de un Triton® X-100 al 1%, fosfato de tributilo al 0,3%, pH 7,5,
1ª etapa de purificación (Q sepharose)	Sin lectura de absorbancia	Mediciones a A280 al comienzo y al final
Filtración viral tras la cromatografía	Filtro Pall DV-20 (20 nm)	Filtro Sartorius Virosart (20 nm)
Concentración e intercambio e tampón tras cromatografía	Tampón Hepes/solución salina pH 7,0 Proteína concentrada hasta 1 mg/ml	Tampón histidina/solución salina pH 6,0 Proteína concentrada hasta 10 mg/ml

Ejemplo 4

Determinación de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble usando un ensayo de microturbidez

5

Se determinó la actividad hialuronidasa de PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20) en muestras tales como cultivos celulares, fracciones de purificación y disoluciones purificadas usando un ensayo turbidimétrico, que se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con albúmina sérica. Se mide la

actividad incubando rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo fijo (10 minutos) y luego precipitando el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina sérica acidificada. Se mide la turbidez de la muestra resultante a 640 nm tras un periodo de revelado de 30 minutos. La disminución en la turbidez resultante de la actividad enzimática sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble. El método se realiza usando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de trabajo de rHuPH20 soluble, y se realizan mediciones de la actividad de la muestra en relación con esta curva de calibración.

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

Se prepararon diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2,5 U/ml en disolución de diluyente enzimático para generar una curva patrón y se añadió a la placa Optilux por triplicado. Las diluciones incluían 0 U/ml, 0,25 U/ml, 0,5 U/ml, 1,0 U/ml, 1,5 U/ml, 2,0 U/ml y 2,5 U/ml. Se incluyeron pocillos de "blanco de reactivo" que contenían 60 μ l de disolución de diluyente enzimático en la placa como control negativo. Entonces se cubrió la placa y se calentó en un bloque térmico durante 5 minutos a 37°C. Se retiró la cubierta y se agitó la placa durante 10 segundos. Tras agitar, se devolvió la placa al bloque térmico y se cebó el dispositivo de manipulación de líquidos MULTIDROP 384 con la disolución de hialuronato de sodio 0,25 mg/ml caliente (preparada disolviendo 100 mg de hialuronato de sodio (LifeCore Biomedical) en 20,0 ml de SWFI. Se mezcló esto girando y/o moviendo suavemente a 2-8°C durante 2-4 horas, o hasta la disolución completa. Se preparó la disolución de sustrato mezclando 9 ml de SWFI, 10 ml de PIPES y 1 ml de hialuronato 5 mg/ml). Se transfirió la placa de reacción al MULTIDROP 384 y se inició la reacción pulsando la clave de inicio para dispensar 30 μ l de hialuronato de sodio en cada pocillo. Entonces se retiró la placa del MULTIDROP 384 y se agitó durante 10 segundos antes de transferirse a un bloque térmico con la cubierta de placa colocada de nuevo. Se incubó la placa a 37°C durante 10 minutos.

Se preparó el MULTIDROP 384 para detener la reacción cebando la máquina con disolución de trabajo de suero (25 ml de disolución madre de suero [se diluyó 1 volumen de suero de caballo (Sigma) con 9 volúmenes de disolución tampón de acetato 500 mM, pH 4,3, y se ajustó el pH a 3,1 con ácido clorhídrico] en 75 ml de disolución tampón de acetato 500 mM, pH 4,3) y cambiando el parámetro de volumen a 240 μ l. Se retiró la placa del bloque térmico y se colocó sobre el MULTIDROP 384 y se dispensaron 240 μ l de disoluciones de trabajo de suero en los pocillos. Se retiró la placa y se agitó en un lector de placas durante 10 segundos. Tras 15 minutos adicionales, se midió la turbidez de las muestras a 640 nm y se determinó la actividad hialuronidasa (en U/ml) de cada muestra mediante ajuste a la curva patrón.

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

Ejemplo 5

Efecto del cloruro de sodio sobre la estabilidad de rHuPH20

La rHuPH20 estaba en una disolución a pH 6,5 que contenía 10 mg/ml en histidina/HCl y cloruro de sodio (NaCl) 130 mM. Tal como se muestra en la tabla 24, se preparó un total de 6 formulaciones diferentes que contenían los siguientes componentes: Tris 25 mM, pH 7,3, rHuPH20 100 μ g/ml, Tween 80 al 0,01% y NaCl (0, 50, 100, 150, 200 ó 250 mM). Se alicuotaron las disoluciones en viales de vidrio de tipo I de 2 ml con tapones de caucho y se sellaron con tapas de aluminio. Se almacenó un conjunto de viales a 40°C durante cuatro días, y se mantuvo el otro conjunto en la nevera de 2 a 8°C.

Tabla 24. Formulación de rHuPH20 con NaCl

Formulación n.º	NaCl
1	0 mM
2	50 mM
3	100 mM
4	150 mM
5	200 mM

6	250 mM
---	--------

Tras 4 días de almacenamiento, se sometió a prueba cada una de las formulaciones mencionadas en la tabla 24 para detectar la actividad enzimática hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el ejemplo 4. Se realizó cromatografía de exclusión molecular (SEC) para evaluar el nivel de agregados usando las siguientes condiciones: 1X PBS, columna Toso BioScience G2000 SWXL columna, velocidad de flujo = 1 ml/min.

La tabla 25 muestra los resultados del estudio, incluyendo actividad hialuronidasa (U/ml), % de área de pico principal (porcentaje de la rHuPH20 que estaba contenida en el área de pico principal) y % de área de pico de agregado (porcentaje de rHuPH20 que estaba contenida en el área de pico atribuida a agregados) para cada formulación. Los resultados indican que la estabilidad de rHuPH20, cuando se incubó a 40°C, era dependiente de la concentración de NaCl: un aumento en la concentración de NaCl condujo a una actividad enzimática aumentada de rHuPH20. Las muestras almacenadas de 2 a 8°C conservaron niveles similares de actividad enzimática de rHuPH20 a lo largo del todo el transcurso del estudio, independientemente de la formulación. En ausencia de NaCl a temperaturas elevadas (40°C), se perdió toda la actividad enzimática de rHuPH20.

Los resultados en la tabla 25 también muestran el efecto de la concentración de NaCl sobre los niveles de agregados de rHuPH20. Los niveles de agregados aumentaron con la concentración decreciente de NaCl en muestras almacenadas a 40°C. No hubo esencialmente ningún cambio en las muestras almacenadas de 2 a 8°C.

Por tanto, los resultados muestran que dentro de la concentración de intervalo de NaCl sometido a prueba (0-250 mM), había una relación directa entre la concentración de NaCl y el aumento de la estabilidad de rHuPH20, lo que sugiere que la concentración de NaCl debe mantenerse tan alta como sea posible dentro de los límites de solubilidad y tonicidad con el fin de aumentar la estabilidad de rHuPH20 a temperatura elevada.

Tabla 25. Actividades enzimáticas y resultados de SEC de las muestras almacenadas 4 días a 40°C y 28°C.

Formulación	Actividad enzimática		% de pico principal		% de pico de agregados	
	2-8°C	40°C	2-8°C	40°C	2-8°C	40°C
NaCl 0 mM	10430	<LOD	99,40	0,00	0,60	100,00
NaCl 50 mM	12370	3070	99,34	22,05	0,66	77,95
NaCl 100 mM	12580	9930	99,47	72,81	0,53	27,19
NaCl 150 mM	12750	11180	99,48	88,16	0,52	11,84
NaCl 200 mM	13660	13340	99,64	96,22	0,36	3,78
NaCl 250 mM	11370	11090	100,00	98,05	0,00	1,95

Ejemplo 6

Estabilidad de rHuPH20 e IG coformuladas

A. Estabilidad del 10% de IG o el 20% de IG coformulada con rHuPH20

Se formuló rHuPH20 tal como sigue: 1 ml contenía 1048071 unidades de hialuronidasa humana recombinante del lote HUB0702CA (generado usando la producción Gen2 descrita en el ejemplo 3) en histidina 10 mM y cloruro de sodio 130 mM (NaCl) a pH 6,0. Se diluyó rHuPH20 hasta 100000 U/ml usando histidina 10 mM + NaCl 130 mM, pH 6,0, antes de mezclar con la inmunoglobulina. Para este fin, se diluyeron 200 µl de disolución madre de rHuPH20 con 1896 ml de tampón histidina/NaCl, pH 6,0.

Se añadió la rHuPH20 prediluida a diferentes formulaciones de IG formuladas en glicina 0,25 M a pH de 4,4 a 4,9 para dar concentraciones finales de 100 U/ml o 300 U/ml en la disolución. Se utilizó de tres lotes del 10% de IG diferentes a partir de la fabricación a gran escala (LE12H020, LE12H062 y LE12H173) o uno de tres lotes del 20% de IG preclínicos diferentes (SC00107NG, SC00207NG y SC00307NG) según la tabla 26. Se filtraron las disoluciones a través de un filtro de 0,2 µm y se transfirieron en porciones de 1 ml a viales de vidrio de 5 ml estériles. Se almacenaron los viales de 2 a 8°C o de 28 a 32°C. Por tanto, se formularon las coformulaciones resultantes de rHuPH20 e IG en glicina 0,25 M a pH de 4,4 a 4,9.

Tabla 26. Coformulaciones de rHuPH20 y el 10% de IG o el 20% de IG

Nombre de la muestra	Cantidad del 10% de IG o el 20% de IG	Cantidad de rHuPH20 diluida hasta 100000 U/ml
10% de IG	50,00 ml	0
10% de IG + rHuPH20 100 U/ml	49,95 ml	50 µl
10% de IG + rHuPH20 300 U/ml	49,85 ml	150 µl
20% de IG	50,00 ml	0
20% de IG + rHuPH20 100 U/ml	49,95 ml	50 µl

Tras 0 (inicio), 1, 3, 6, 12, 24 y 36 semanas (de 2 a 8°C sólo) de almacenamiento, se retiró una muestra de cada una de las 6 formulaciones mencionadas en la tabla 26 y de cada una de las cámaras de almacenamiento (de 2 a 8°C y de 28 a 32°C) de la incubación y se analizó para determinar la actividad hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el ejemplo 4. Para evaluar los efectos sobre IG, se determinó la distribución de tamaño molecular de la IG en formulaciones que contenían el 20% de IG a 0 (inicio) y 6 meses mediante cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HP-SEC) usando una columna TSK G 3000 SW 600 x 7,5 mm (Tosoh Bioscience) y un sistema de tampón que contenía DMSO (Kolarich *et al.* (2006) Transfusion, 46:1959-1977).

La tabla 27 muestra la actividad hialuronidasa (U/ml) a 7 puntos de tiempo (0, 1, 3, 6, 12, 24 y 36 semanas) para cada coformulación almacenada de 2 a 8°C. La tabla 28 muestra la actividad hialuronidasa (U/ml) a 6 puntos de tiempo (0, 1, 3, 6, 12 y 24 semanas) para las coformulaciones almacenadas de 28 a 32°C. Se observó una pérdida significativa, estable de actividad hialuronidasa en presencia de coformulaciones del 10% y el 20% de IG almacenadas de 28 a 32°C tras 24 semanas, indicando inestabilidad de rHuPH20. Las coformulaciones del 10% de IG eran estables tras 9 meses de almacenamiento de 2 a 8°C, mientras que la actividad de rHuPH20 disminuyó ligeramente en las coformulaciones del 20% de IG. La distribución de tamaño molecular de la IG en formulaciones que contenían el 20% de IG no cambió a ambas temperaturas tras 6 meses de almacenamiento (tablas 29 y 30).

Tabla 27. Actividad hialuronidasa (U/ml) de coformulaciones tras almacenamiento a 2-8°C

Muestra	Semanas						
	0 (inicio)	1	3	6	12	24	36
LE12H020+100 U/ml	99,2	95,4	97,3	101	93	92	98
LE12H020+300 U/ml	298,5	321,7	285,9	299	283	271	291
LE12H062+100 U/ml	108,5	97,5	99,6	103	99	92	102
LE12H062+300 U/ml	325	306,8	297,9	302	273	279	300
LE12H173+100 U/ml	103,1	95,9	97,3	107	98	99	106
LE12H173+300 U/ml	295,0	291,2	281,8	293	282	296	292
SC00107NG+100 U/ml	94,0	97,8	81,4	85	87	78	66
SC00107NG+300 U/ml	284,3	280,2	264,0	261	245	223	210
SC00207NG+100 U/ml	99,7	93,1	91,0	86	83	84	69
SC00207NG+300 U/ml	286	277	266,2	244	263	227	197
SC00307NG+100 U/ml	92,8	95,0	82,7	87	83	82	68
SC00307NG+300 U/ml	254,3	281,4	274,3	245	247	230	256

Tabla 28. Actividad hialuronidasa (U/ml) de coformulaciones tras almacenamiento a 28-32°C

Muestra	Semanas					
	0 (inicio)	1	3	6	12	24
LE12H020+100 U/ml	99,2	84,9	59,6	36	22	5
LE12H020+300 U/ml	298,5	259,3	185,4	104	57	19
LE12H062+100 U/ml	108,5	88,2	60,1	43	29	10
LE12H062+300 U/ml	325	266,2	185,6	129	76	28
LE12H173+100 U/ml	103,1	70,5	39,6	24	13	1
LE12H173+300 U/ml	295,0	210,1	122,0	60	31	9
SC00107NG+100 U/ml	94,0	83,1	57,4	43	49	32
SC00107NG+300 U/ml	284,3	242,2	182,0	124	148	96
SC00207NG+100 U/ml	99,7	84,5	61,1	46	51	35
SC00207NG+300 U/ml	286	251	198,1	131	145	106
SC00307NG+100 U/ml	92,8	82,7	67,9	48	52	34
SC00307NG+300 U/ml	254,3	253,6	209,7	140	157	106

Tabla 29. Distribución de tamaño molecular de IG en el 20% de IG coformulada con rHuPH20 tras almacenamiento a 2-8°C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
SC00107NG	0,67	12,56	86,50	0,27	0,70	13,50	85,50	0,30
SC00107NG + rHuPH20 100 U/ml	0,62	12,39	86,75	0,24	0,70	13,59	85,43	0,28
SC00107NG + rHuPH20 300 U/ml	0,65	12,38	86,70	0,26	0,69	13,80	85,19	0,32
SC00207NG	0,73	13,25	85,76	0,26	0,86	14,52	84,34	0,28

SC002071NG + rHuPH20 100 U/ml	0,75	13,22	85,74	0,29	0,86	14,61	84,21	0,32
SC00207NG + rHuPH20 300 U/ml	0,77	13,39	85,63	0,21	0,83	14,57	84,30	0,30
SC00307NG	0,93	11,76	87,06	0,25	1,01	12,78	85,96	0,25
SC00307NG + rHuPH20 100 U/ml	0,96	11,91	86,94	0,20	1,03	13,04	85,62	0,31
SC00307NG + rHuPH20 300 U/ml	0,91	12,00	86,86	0,23	0,99	12,88	85,85	0,27

Tabla 30. Distribución de tamaño molecular de IG en el 20% de IG coformulada con rHuPH20 tras almacenamiento a 28-32°C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
SC00107NG	0,67	12,56	86,50	0,27	0,50	12,53	85,94	1,02
SC00107NG + rHuPH20 100 U/ml	0,62	12,39	86,75	0,24	0,47	12,41	86,10	1,02
SC00107NG + rHuPH20 300 U/ml	0,65	12,38	86,70	0,26	0,52	12,41	85,97	1,09
SC00207NG	0,73	13,25	85,76	0,26	0,44	13,21	85,42	0,94
SC00207NG + rHuPH20 100 U/ml	0,75	13,22	85,74	0,29	0,42	13,15	85,52	0,91
SC00207NG + rHuPH20 300 U/ml	0,77	13,39	85,63	0,21	0,47	13,01	85,62	0,90
SC00307NG	0,93	11,76	87,06	0,25	0,47	11,91	86,78	0,84
SC00307NG + rHuPH20 100 U/ml	0,96	11,91	86,94	0,20	0,50	11,85	86,78	0,87
SC00307NG + rHuPH20 300 U/ml	0,91	12,00	86,86	0,23	0,40	11,50	87,21	0,89

5

B. Estabilidad del 10% de IG con rHuPH20 y cloruro de sodio (0-150 mM)

Para mejorar la estabilidad de rHuPH20 en las coformulaciones, se investigó el efecto de la adición de cloruro de sodio (NaCl). Se prepararon coformulaciones de rHuPH20 300 U/ml (lote HUB0702CA; generado usando la producción Gen2 descrita en el ejemplo 3) en el 10% de IG (lote LE12F047) tal como se describió en el ejemplo 7A anteriormente, con la adición de NaCl a 4 concentraciones diferentes (0, 50, 100 y 150 mM). Se almacenaron las coformulaciones de 2 a 8°C o de 28 a 32°C. Por tanto, se formularon las coformulaciones resultantes de rHuPH20 y IG en glicina 0,25 M a pH de 4,6 a 5,1 (tal como se mide en la disolución diluida) en presencia de cantidades variables de NaCl.

15

Tras 0 (inicio), 1, 3, 6, 12, 18 y 24 semanas de almacenamiento, se retiró una muestra de cada una de las coformulaciones (con concentraciones de NaCl de 0,50, 100 y 150 mM) y de cada una de las cámaras de almacenamiento (de 2 a 8°C y de 28 a 32°C) de la incubación y se analizó para determinar la actividad hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el ejemplo 4. Se determinó la agregación de IG mediante la distribución de tamaño molecular (MSD) mediante cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HP-SEC) usando una columna TSK G 3000 SW 600 x 7,5mm y un sistema de tampón que contenía DMSO (Kolarich *et al.* (2006) Transfusion, 46:1959-1977).

20

Las tablas 31 y 32 muestran la actividad hialuronidasa (U/ml) a 7 puntos de tiempo (0, 1, 3, 6, 12, 18 y 24 semanas) para cada coformulación. Los resultados muestran que la estabilidad de rHuPH20 coformulada con el 10% de IG en presencia de NaCl 50, 100 ó 150 mM permaneció sin cambios hasta 24 semanas de almacenamiento de 2 a 8°C, mientras que la estabilidad de rHuPH20 mejoró para las muestras almacenadas de 28 a 32°C. Sin embargo, la actividad hialuronidasa disminuyó rápidamente en las coformulaciones que tenían una concentración de NaCl de 0 mM cuando se almacenaron de 28 a 32°C.

25

30

Las tablas 33 y 34 muestran que NaCl potenció ligeramente la dimerización de IG (~350 kDa) a ambas temperaturas de almacenamiento y la agregación de IG (>450 kDa) de 28 a 32°C, y todos los valores permanecieron dentro de los límites de especificación de MSD ($\geq 90\%$ de monómero/dímeros, $\leq 5\%$ de agregados, $\leq 5\%$ de fragmentos) tras 6 meses.

35

Aunque la adición de NaCl tuvo un impacto negativo (aumentó) el título de actividad anticomplementaria (ACA) de formulaciones de IG almacenadas de 28 a 32°C, el título de ACA es un indicador de especificación para administración intravenosa (i.v.) y no es relevante para la administración subcutánea de las coformulaciones.

Tabla 31. Actividad hialuronidasa (U/ml) de coformulaciones del 10% de IG/rHuPH20 con NaCl tras almacenamiento a 2-8°C

Conc. de sal	Semanas							
	0 (inicio)	1	2	3	6	12	18	24
NaCl 0 mM	276	288	269	289	317	264	276	274
50 mM	292	286	296	306	320	287	276	295
100 mM	285	295	273	315	319	287	281	288
150 mM	294	280	301	305	327	294	277	298

5 Tabla 32. Actividad hialuronidasa (U/ml) de coformulaciones del 10% de IG/rHuPH20 con NaCl tras almacenamiento a 28-32°C

Conc. de sal	Semanas							
	0 (inicio)	1	2	3	6	12	18	24
0 mM	276	232	237	216	201	121	109	81
50 mM	292	288	280	301	302	247	225	223
100 mM	285	286	280	292	315	277	253	258
150 mM	294	314	272	298	323	221	253	276

10 Tabla 33. Distribución de tamaño molecular de IG en coformulaciones del 10% de IG/rHuPH20 con NaCl tras almacenamiento a 2-8°C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
NaCl 0 mM	0,16	8,21	91,01	0,61	0,16	11,29	87,98	0,58
NaCl 50 mM	0,17	8,99	90,24	0,60	0,22	12,54	86,62	0,62
NaCl 100 mM	0,19	9,03	90,13	0,64	0,23	12,97	86,17	0,63
NaCl 150 mM	0,19	9,08	90,13	0,61	0,24	12,93	86,30	0,53

15 Tabla 34. Distribución de tamaño molecular de IG en coformulaciones del 10% de IG/rHuPH20 con NaCl tras almacenamiento a 28-32°C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
NaCl 0 mM	0,16	8,21	91,01	0,61	0,35	9,37	88,77	1,51
NaCl 50 mM	0,17	8,99	90,24	0,60	0,75	10,83	86,85	1,57
NaCl 100 mM	0,19	9,03	90,13	0,64	0,87	11,20	86,38	1,55
NaCl 150 mM	0,19	9,08	90,13	0,61	1,02	11,15	86,18	1,66

C. Estabilidad del 10% de IG o el 20% de IG coformulada con rHuPH20 y cloruro de sodio (0-50 mM)

20 Se investigó el efecto de la adición de cloruro de sodio a coformulaciones del 10% de IG o el 20% de IG con rHuPH20 almacenadas de 28 a 32°C. Se prepararon coformulaciones de rHuPH20 300 U/ml (lote HUB0702CA; generado usando la producción Gen2 descrita en el ejemplo 1) en el 10% de IG (lote LE12F047) y rHuPH20 300 U/ml (lote HUB0702CA; generado usando la producción Gen2 descrita en el ejemplo 1) en el 20% de IG (lote SC00108NG) tal como se describió en el ejemplo 6B anteriormente, usando concentraciones de NaCl de 0,5, 10, 20, 30, 40 y 50 mM. Por tanto, se formularon las coformulaciones resultantes de rHuPH20 y IG en glicina 0,25 M a pH de 4,6 a 5,1 (tal como se mide en la disolución diluida) en presencia de cantidades variables de NaCl.

30 Tras 0 (inicio), 1, 3, 6, 12 y 24 semanas de almacenamiento se retiró una muestra de cada una de las coformulaciones (con concentraciones de NaCl de 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mM) de la incubación y se analizó para determinar la actividad hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el ejemplo 4. Se determinó la agregación de IG mediante la distribución de tamaño molecular mediante cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HP-SEC) usando una columna TSK G 3000 SW 600 x 7,5 mm y un sistema de tampón que contenía DMSO.

35 Las tablas 35 y 36 muestran la actividad hialuronidasa (U/ml) a diversos puntos de tiempo (0, 1, 3, 6 y 12 y 24 semanas) para cada coformulación. Los resultados muestran que la estabilidad de rHuPH20 coformulada con el 10% de IG en presencia de concentraciones superiores de NaCl (20, 30, 40 y 50 mM) permaneció relativamente sin cambios a lo largo de 24 semanas de almacenamiento de 28 a 32°C. La actividad hialuronidasa disminuyó

rápidamente en las coformulaciones que tenían una concentración de NaCl de menos de 20 mM cuando se almacenaron de 28 a 32°C. La estabilidad de rHuPH20 coformulada con el 20% de IG permaneció relativamente sin cambios a lo largo de 24 semanas de almacenamiento de 28 a 32°C a todas las concentraciones de NaCl.

- 5 El cloruro de sodio potenció ligeramente la dimerización (~350 kDa) y la agregación de IG en coformulaciones del 10% y el 20% de IG de 28 a 32°C. El efecto es menos pronunciado en el 20% de IG (es decir, concentración de IG superior) sobre la agregación de IG (tablas 37 y 38).

10 Tabla 35. Actividad hialuronidasa (U/ml) de Coformulaciones del 10% de IG/rHuPH20 con NaCl tras almacenamiento a 28-32°C

Conc. de sal	Semanas					
	0	1	3	6	12	24
0 mM	292	260	225	211	135	<87
5 mM	294	247	242	225	162	<87
10 mM	272	255	242	240	177	91
20 mM	281	302	261	259	232	154
30 mM	279	273	256	261	229	180
40 mM	274	254	266	275	246	196
50 mM	275	254	278	281	252	200

Tabla 36. Actividad hialuronidasa (U/ml) de coformulaciones del 20% de IG/rHuPH20 con NaCl tras almacenamiento a 28-32°C

Conc. de sal	Semanas					
	0	1	3	6	12	24
0 mM	267	264	251	238	212	138
5 mM	290	261	249	242	214	143
10 mM	276	264	262	232	207	141
20 mM	314	249	274	239	222	155
30 mM	252	253	276	241	211	162
40 mM	273	240	275	242	216	170
50 mM	289	238	266	234	232	165

15 Tabla 37. Distribución de tamaño molecular de IG en coformulaciones del 10% de IG/rHuPH20 con NaCl tras almacenamiento a 28-32°C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
NaCl 0 mM	0,16	9,35	90,01	0,48	0,19	7,08	91,69	1,04
NaCl 5 mM	0,16	9,53	89,71	0,60	0,21	7,66	91,11	1,02
NaCl 10 mM	0,16	9,77	89,52	0,56	0,22	8,20	90,52	1,05
NaCl 20 mM	0,17	9,96	89,27	0,60	0,26	8,42	90,27	1,05
NaCl 30 mM	0,17	10,25	89,06	0,53	0,30	9,07	89,59	1,04
NaCl 40 mM	0,17	10,48	88,82	0,53	0,34	9,06	89,56	1,05
NaCl 50 mM	0,18	10,55	88,72	0,54	0,39	9,22	89,33	1,07

20 Tabla 38. Distribución de tamaño molecular de IG en coformulaciones del 20% de IG/rHuPH20 con NaCl tras almacenamiento a 28-32°C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
NaCl 0 mM	0,32	14,65	84,72	0,31	0,34	11,77	87,18	0,71
NaCl 5 mM	0,32	14,70	84,70	0,27	0,34	11,57	87,35	0,74
NaCl 10 mM	0,35	14,86	84,48	0,31	0,35	12,05	86,94	0,67
NaCl 20 mM	0,30	14,95	84,48	0,27	0,37	12,17	86,76	0,69
NaCl 30 mM	0,32	15,12	84,29	0,27	0,40	12,60	86,32	0,68
NaCl 40 mM	0,32	14,92	84,48	0,27	0,47	12,68	86,16	0,69
NaCl 50 mM	0,33	15,00	84,36	0,30	0,45	12,56	86,34	0,65

- 25 D. Estabilidad de rHuPH20 en coformulaciones con el 10% de IG o el 20% de IG en presencia de cloruro de sodio (100-250 mM) o aminoácidos (500 mM)

Se estudió el efecto sobre la estabilidad de rHuPH20 de coformulaciones que contenían el 10% de IG o el 20% de IG con rHuPH20 y cloruro de sodio o estabilizador de aminoácidos. Se prepararon coformulaciones de rHuPH20 100 U/ml o 300 U/ml (lote HUB0702CA; generado usando la producción Gen2 descrita en el ejemplo 3) en el 10% de IG (con glicina 0,25 M a pH 4,4) (lote LE12F047) o el 20% de IG (lote SC00108NG) tal como se describió en el ejemplo 6A anteriormente. Las muestras contenían o bien NaCl (concentraciones de 100, 150 o 250 mM), glicina (500 mM) o bien prolina (500 mM). Se almacenaron las coformulaciones de 2 a 8°C o de 28 a 32°C. Por tanto, se formularon las coformulaciones resultantes de rHuPH20 e IG en glicina 0,25 M a pH de 4,6 a 5,1 en presencia de cantidades variables de NaCl, glicina o prolina.

Tras 0 (inicio), 1, 2, 3, 6 y 12 (300 U/ml sólo) semanas de almacenamiento, se retiró una muestra de cada una de las coformulaciones (con o bien concentraciones de NaCl de 100, 150 o 250 mM, concentración de glicina de 500 mM o bien concentración de prolina de 500 mM) de la incubación y se analizó para determinar la actividad hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el ejemplo 4. Se determinó la agregación de IG mediante la distribución de tamaño molecular a 0 (inicio) y 12 semanas mediante cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HP-SEC) usando una columna TSK G 3000 SW 600 x 7,5 mm y un sistema de tampón que contenía DMSO (Kolarich *et al.* (2006) Transfusion, 46:1959-1977).

Las tablas 39 y 41 muestran la actividad hialuronidasa (U/ml) a 5 puntos de tiempo (0, 1, 2, 3 y 6 semanas) para coformulaciones que contenían rHuPH20 100 U/ml y el 10% o el 20% de IG, respectivamente. Las tablas 40 y 42 muestran la actividad hialuronidasa (U/ml) a 6 puntos de tiempo (0, 1, 2, 3, 6 y 12 semanas) para coformulaciones que contienen rHuPH20 300 U/ml y el 10% o el 20% de IG, respectivamente. Los resultados muestran que altas concentraciones de aminoácido (glicina 500 mM o prolina 500 mM) eran menos eficaces que NaCl en la estabilización de rHuPH20 en coformulaciones del 10% de IG o el 20% de IG con rHuPH20.

El cloruro de sodio, a todas las concentraciones estudiadas, potenció la agregación de (>450 kDa) tras almacenamiento de 28 a 32°C en todas las coformulaciones. Todas las coformulaciones que contenían prolina 500 mM tienen un contenido reducido en dímeros de IG (~350 kDa) y un contenido aumentado en monómero (~160 kDa) tras 6 semanas de almacenamiento de 28 a 32°C. El contenido en dímeros de IG también se redujo en coformulaciones con glicina, aunque no tan pronunciado como en las coformulaciones con prolina (tablas 43 y 44). Altas concentraciones de prolina han demostrado ser eficaces en la inhibición de la agregación de proteínas durante el repliegamiento bloqueando eficazmente interacciones hidrófobas no específicas entre proteínas (Kumar *et al.* (1998) Biochem. Mol. Biol. Int. 4:59-517).

Tabla 39. Actividad hialuronidasa (U/ml) de coformulaciones del 10% de IG y rHuPH20 100 U/ml con estabilizadores tras almacenamiento a 28-32°C

Concentración de estabilizador	Semanas					
	0 (inicio)	1	2	3	6	12
NaCl 100mM	97	97	88	99	85	84
NaCl 150mM	99	91	102	93	94	85
NaCl 250mM	89	105	93	88	91	89
Glicina 500mM	94	105	85	84	77	56
Prolina 500mM	88	96	83	80	88	59

Tabla 40. Actividad hialuronidasa (U/ml) de coformulaciones del 10% de IG y rHuPH20 300 U/ml con estabilizadores tras almacenamiento a 28-32°C

Concentración de estabilizador	Semanas					
	0 (inicio)	1	2	3	6	12
NaCl 100mM	294	303	284	266	260	233
NaCl 150mM	301	282	280	272	288	246
NaCl 250mM	280	290	275	278	255	250
Glicina 500mM	254	296	246	256	229	194
Prolina 500mM	242	304	266	244	226	204

Tabla 41. Actividad hialuronidasa (U/ml) de coformulaciones del 20% de IG y rHuPH20 100 U/ml con estabilizadores tras almacenamiento a 28-32°C

Concentración de estabilizador	Semanas					
	0 (inicio)	1	2	3	6	12
NaCl 100mM	268	313	262	256	223	214
NaCl 150mM	252	292	249	260	232	202
NaCl 250mM	262	302	270	254	236	213
Glicina 500mM	285	286	291	244	221	191
Prolina 500mM	308	303	242	248	230	197

Tabla 42. Actividad hialuronidasa (U/ml) de coformulaciones del 20% de IG y rHuPH20 300 U/ml con estabilizadores tras almacenamiento a 28-32°C

Concentración de estabilizador	Semanas					
	0 (inicio)	1	2	3	6	12
NaCl 100mM	268	266	264	226	237	255
NaCl 150mM	252	256	270	220	231	261
NaCl 250mM	262	243	273	246	243	273
Glicina 500mM	285	257	289	211	230	267
Prolina 500mM	308	257	268	231	229	259

5

Tabla 43. Distribución de tamaño molecular de IG en coformulaciones del 10% de IG/rHuPH20 con NaCl, glicina o prolina tras almacenamiento a 28-32°C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
10% de IG + rHuPH20 100 U/ml + NaCl 250 mM	0,15	10,92	88,35	0,59	0,50	9,58	89,13	0,80
10% de IG + 300 U/ml rHuPH20 + NaCl 250 mM	0,14	11,05	88,27	0,54	0,46	9,59	89,11	0,84
10% de IG + rHuPH20 100 U/ml + NaCl 150 mM	0,14	11,07	88,15	0,65	0,45	9,71	88,97	0,87
10% de IG + rHuPH20 300 U/ml + NaCl 150 mM	0,14	11,42	87,82	0,62	0,45	9,76	89,09	0,70
10% de IG + rHuPH20 100 U/ml + NaCl 100 mM	0,18	11,29	87,91	0,63	0,38	9,36	89,53	0,74
10% de IG + rHuPH20 300 U/ml + NaCl 100 mM	0,13	11,43	87,89	0,55	0,38	9,32	89,52	0,78
10% de IG + rHuPH20 100 U/ml + glicina 500 mM	0,16	10,67	88,55	0,62	0,12	8,12	90,92	0,84
10% de IG + rHuPH20 300 U/ml + glicina 100 mM	0,16	10,80	88,43	0,61	0,16	8,17	90,95	0,73
10% de IG + rHuPH20 100 U/ml + prolina 500 mM	0,14	9,55	89,75	0,56	0,11	5,53	93,58	0,78
10% de IG + rHuPH20 300 U/ml + prolina 100 mM	0,14	9,43	89,86	0,57	0,12	5,65	93,52	0,71

10 Tabla 44. Distribución de tamaño molecular de IG en coformulaciones del 20% de IG/rHuPH20 con NaCl, glicina o prolina tras almacenamiento a 28-32°C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
20% de IG + rHuPH20 100 U/ml + NaCl 250 mM	0,25	15,03	84,28	0,44	0,48	12,55	86,37	0,60
20% de IG + 300 U/ml rHuPH20 + NaCl 250 mM	0,26	15,12	84,16	0,46	0,51	12,53	86,36	0,59
20% de IG + rHuPH20 100 U/ml + NaCl 150 mM	0,26	15,32	83,97	0,45	0,45	12,74	86,12	0,69
20% de IG + rHuPH20 300 U/ml + NaCl 150 mM	0,25	15,21	84,08	0,46	0,47	12,78	86,13	0,61
20% de IG + rHuPH20 100 U/ml + NaCl 100 mM	0,24	15,40	83,87	0,50	0,43	12,69	86,24	0,65
20% de IG + rHuPH20 300 U/ml + NaCl 100 mM	0,25	15,53	83,81	0,42	0,48	12,72	86,17	0,63
20% de IG + rHuPH20 100 U/ml + glicina 500 mM	0,21	14,40	84,99	0,39	0,22	12,31	86,90	0,56
10% de IG + rHuPH20 300 U/ml + glicina 100 mM	0,21	14,38	85,00	0,41	0,22	12,47	86,73	0,58
20% de IG + rHuPH20 100 U/ml + prolina 500 mM	0,25	15,47	83,83	0,45	0,24	10,18	88,92	0,66
20% de IG + rHuPH20 300 U/ml + prolina 100 mM	0,25	15,72	83,54	0,49	0,24	10,35	88,81	0,61

U/ml + prolina 100 mM								
-----------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

Ejemplo 7

Efectos de rHuPH20 y el 10% de IG o el 20% de IG coformuladas en minicerdos del Yucatán

A. Diseño experimental

Se determinó la viabilidad de la dosificación de rHuPH20 coformulada con disolución del 10% o el 20% de inmunoglobulina (IG) (NaCl 130 mM, histidina 10 mM, pH 6,6) por vía subcutánea en minicerdos del Yucatán y se comparó con la dosificación de vanguardia (dosificación sucesiva de rHuPH20 seguida por disolución de IG). También se evaluó una respuesta a la dosis utilizando varias concentraciones de rHuPH20 para cada disolución de IG.

Se asignaron dieciocho minicerdos del Yucatán macho que pesaban 18,4 - 23,2 kg (SNS Farms) a uno o dos de once grupos de tratamiento tal como se muestran en la tabla 45 de modo que cada grupo utilizó tres cerdos. Se administraron todas las formulaciones por vía subcutánea con agujas Huber de ángulo suave a 90 grados de calibre 10 en los lomos de cerdos macho anestesiados. Para la dosificación de vanguardia, se inyectó rHuPH20 seguida por IgG consecutivamente usando la misma aguja en la ubicación exacta, empleando un cambio de jeringa sencillo. No se requirió ni se empleó retardo entre la dosificación de rHuPH20 e IgG. Se sometieron a prueba hasta dos formulaciones diferentes, cada una de un grupo de tratamiento diferente, en cada cerdo a un valor máximo de 110 ml por sitio de inyección. Las infusiones duraron aproximadamente 20 minutos para las coformulaciones y 22-28 minutos para las formulaciones de vanguardia.

Tabla 45. Resumen de diseño experimental

Grupo	Tratamiento	Tipo de dosis	Volumen de dosis total (ml)
1	100 ml del 10% de IG	Coformulación	100
2	100 ml del 10% de IG / rHuPH20 (50 U/ml)	Coformulación	100
3	100 ml del 10% de IG / rHuPH20 (100 U/ml)	Coformulación	100
4	100 ml del 10% de IG / rHuPH20 (300 U/ml)	Coformulación	100
5	50 ml del 20% de IG	Coformulación	50
6	50 ml del 20% de IG / rHuPH20 (50 U/ml)	Coformulación	50
7	50 ml del 20% de IG / rHuPH20 (100 U/ml)	Coformulación	50
8	50 ml del 20% de IG / rHuPH20 (300 U/ml)	Coformulación	50
9	10 ml de rHuPH20 (150 U/ml) + 100 ml del 10% de IG	De vanguardia	110
10	20 ml de rHuPH20 (150 U/ml) + 50 ml del 20% de IG	De vanguardia	60
11	20 ml de rHuPH20 (150 U/ml) + 50 ml del 20% de IG	De vanguardia	70

Se evaluaron las observaciones en el sitio de inyección tras la dosificación. Se utilizaron transductores para medir la presión continua (mmHg) ejercida para administrar cada formulación, y se recogió sangre para recuento de sangre completa (CBC) y análisis de inmunoglobulina gamma (IgG). A la terminación del estudio, 3 días tras la dosificación, se sacrificaron todos los animales y se recogieron dos secciones de muestra (A y B) de cada de sitio de inyección 1, sitio de inyección 2 y control (recogido de un sitio distante de los dos sitios de inyección) y se conservaron en formalina tamponada neutra al 10%, y se evaluaron mediante microscopía óptica (Nova Pathology, PC, San Diego, CA). El sitio A era una sección de 2-3 mm de grosor a través del centro del sitio de inyección y el sitio B era una sección de 2-3 mm de grosor tomada del extremo del sitio de inyección recogido.

B. Observaciones del sitio de inyección

En el plazo de 5 minutos de la dosificación del 10% de IG sola (~ 25 ml en infusión; grupo 1), era visible una "ampolla" distinta en los tres cerdos. Aproximadamente 10 minutos tras la dosificación del 20% de IG sola (~ 25 ml en infusión; grupo 5), era visible una ampolla distinta. El área de formación de ampollas observada aumentó con todas las formulaciones que contenían rHuPH20 (incluyendo la de vanguardia) en comparación con la dosificación de IG sola, lo que significa mayor dispersión de fluidos cuando se utiliza rHuPH20 (tabla 46).

Coformulaciones de rHuPH20 con el 10% y el 20% de IG dieron como resultado un endurecimiento significativamente reducido de la piel a todas las concentraciones de rHuPH20 (los sitios permanecieron blandos), y color rosa/enrojecimiento reducido de la piel en todos las concentraciones de rHuPH20. La dosificación de comparación de vanguardia dio como resultado observaciones de color rosa/enrojecimiento similares como coformulaciones. Las apariciones de color rosa/enrojecimiento en sitios de inyección observadas tras la dosificación mostraron una recuperación completa en el plazo de 24 horas para todos los grupos (tabla 46).

Tabla 46. Aspecto del sitio de inyección y análisis

Grupo	Tratamiento	Área de ampolla media (cm ²)	Observación de ampollas media
1	100 ml del 10% de IG	97,5	Ligeramente rosa; duro
2	100 ml del 10% de IG / rHuPH20 (50 U/ml)	91,7	Ligeramente rosa; blando
3	100 ml del 10% de IG / rHuPH20 (100 U/ml)	180,3	Ligeramente rosa/rosa; blando
4	100 ml del 10% de IG / rHuPH20 (300 U/ml)	178,0	Ligeramente rosa/rosa; blando
5	50 ml del 20% de IG	95,2	Rosa/rojo; duro
6	50 ml del 20% de IG / rHuPH20 (50 U/ml)	102,6	Rosa/rojo; blando
7	50 ml del 20% de IG / rHuPH20 (100 U/ml)	111,9	Ligeramente rosa/rosa; blando
8	50 ml del 20% de IG / rHuPH20 (300 U/ml)	111,1	Normal; blando
9	10 ml de rHuPH20 (150 U/ml) + 100 ml del 10% de IG	173,5	Normal; blando
10	20 ml de rHuPH20 (150 U/ml) + 50 ml del 20% de IG	116,8	Normal/ligeramente rosa; blando
11	20 ml de rHuPH20 (150 U/ml) + 50 ml del 20% de IG	131,4	Normal/ligeramente rosa; blando

C. Observaciones de medición de la presión

- 5 La tabla 47 resume las mediciones de presión media. A los 2,5 minutos o más pronto tras la dosificación del 20% de IG sola (grupo 5), las presiones estaban fuera del intervalo medible (>460 mmHg) para los tres cerdos. Dos de tres cerdos estaban fuera del intervalo de presión medible en el grupo 6, y un cerdo estaba fuera para cada uno de los grupos 7 y 8. Los grupos 1 y 2 tenían cada uno un cerdo fuera del intervalo. Los resultados muestran que la presión necesaria para lograr las inyecciones disminuyó con todas las coformulaciones que contenían rHuPH20.

10

Tabla 47. Análisis de medición de presión media

Grupo	N	Presión media (mmHg)	Presión máx. de elevación (mmHg)	Presión máx. (mmHg)	Tiempo máx. de elevación (min)	Tiempo máx. (min)
1	2	242	266	281	2,7	5,1
2	2	209	N/A*	223	N/A*	4,0
3	3	164	0,3	223	0,3	4,1
4	3	289	0,5	255	0,5	2,3
5	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	1	164	250	250	1,6	1,6
7	2	179	215	215	0,7	0,7
8	2	194	188	203	1,6	4,6
9	3	117	119	125	1,9	4,9
10	3	241	232	261	3,8	12,9
11	3	241	281	264	4,7	15,2

N/A = No disponible, >460 mmHg

15

N/A* = Curva de elevación del registro de presión poco clara de interpretar

D. Recuento de sangre completa y análisis de plasma de IgG

- 20 Se recogió sangre en tubos K₃EDTA antes de la dosis (~2,0 ml) y a los 30 minutos tras la dosificación (~2,0 ml) para el análisis de recuento de sangre completa (CBC). Se almacenaron las muestras a 4°C hasta el análisis (Bioquant, Inc., San Diego, CA). Los resultados de CBC no dan ningún problema de seguridad relacionado con el producto. La mayoría de los cerdos permanecen dentro de niveles de CBC normales (intervalo de CBC normal al que se hace referencia de SNS farms). Cinco de dieciocho cerdos tenían coágulos no visibles en las muestras y no pudieron evaluarse.

25

Se recogió sangre para el análisis de inmunoglobulina gamma (IgG) en tubos con citrato de sodio antes de la dosis (~2,0 ml) y a la terminación del estudio (~4,0 ml) para confirmar la disponibilidad sistémica tras la administración subcutánea de IgG humana. Se centrifugaron las muestras a 4°C durante 10 minutos a 3000 rpm, se alicuotó el

plasma y se almacenaron las muestras a -20°C hasta su análisis. Se observó un aumento general en IgG en los todos los animales tras 3 días de la administración, tal como se muestra en la tabla 48. Los niveles en plasma de IgG para cada cerdo reflejan la media de los dos tratamientos diferentes que se administraron a cada cerdo (con la excepción de los cerdos 7-9 que recibieron solamente un único tratamiento).

5

Tabla 48. Análisis de IgG

N.º de cerdo	Grupo(s) de tratamiento	IgG (g/l)	
		Predosis	Terminación
1	1 y 2	3,46	8,53
2	1 y 2	2,97	9,27
3	1 y 2	4,35	9,03
4	3 y 4	6,67	10,51
5	3 y 4	3,81	10,15
6	3 y 4	4,79	9,83
7	5	4,96	6,06
8	5	3,50	5,94
9	5	3,73	6,86
10	6 y 7	2,83	8,19
11	6 y 7	3,47	10,08
12	6 y 7	4,08	11,12
13	8 y 9	5,07	9,62
14	8 y 9	4,02	8,82
15	8 y 9	3,94	8,63
16	10 y 11	3,97	9,25
17	10 y 11	4,60	9,68
18	10 y 11	4,76	9,51

E. Resultados de histopatología

10

Estaban presentes hallazgos histopatológicos en la epidermis, dermis y tejido subcutáneo, y contenían una mezcla de inflamación de leucocitos, edema y hemorragia. Se asignó cada hallazgo histopatológico a un grado de gravedad basándose en el siguiente esquema: No presente: 0; presente, no graduado: 0; mínimo: 1; leve: 2; moderado: 3; marcado: 4. Los hallazgos histopatológicos se resumen por la incidencia y la puntuación de gravedad de grupo media en las tablas 49-51.

15

Tabla 49. Resumen de hallazgos histológicos: el 10% de IG + rHuPH20

Hallazgos histológicos	Grupo de tratamiento			
	1	2	3	4
Inflamación, leucocitos mixtos, subcutánea	6/6*	6/6	5/6	6/6
<i>Puntuación de gravedad de grupo media**</i>	1,83	1,00	1,00	1,17
Edema, subcutáneo	6/6	5/6	6/6	5/6
<i>Puntuación de gravedad de grupo media**</i>	2,00	0,83	1,00	1,17
Hemorragia, subcutánea	3/6	3/6	2/6	1/6
<i>Puntuación de gravedad de grupo media**</i>	0,67	0,50	0,33	0,33
<i>Suma de puntuaciones de gravedad de grupo medias</i>	4,50	2,33	2,33	2,67

20 * Número de secciones afectadas / número de secciones evaluadas

** Suma de puntuaciones de gravedad en el grupo dividida entre el número de secciones evaluadas en el grupo

Tabla 50. Sumario de hallazgos histológicos: el 20% de IG + rHuPH20

25

Hallazgos histológicos	Grupo de tratamiento			
	5	6	7	8
Inflamación, leucocitos mixtos, subcutánea	6/6*	6/6	5/6	6/6
<i>Puntuación de gravedad de grupo media**</i>	1,00	1,17	1,00	2,17
Edema, subcutáneo	6/6	6/6	5/6	5/6
<i>Puntuación de gravedad de grupo media**</i>	1,17	1,17	1,17	2,00

Hemorragia, subcutánea	0/6	2/6	0/6	1/6
<i>Puntuación de gravedad de grupo media**</i>	0,00	0,33	0,00	0,17
<i>Suma de puntuaciones de gravedad de grupo medias</i>	2,17	2,67	2,17	4,34

* Número de secciones afectadas / número de secciones evaluadas

** Suma de puntuaciones de gravedad en el grupo dividida entre el número de secciones evaluadas en el grupo

5

Tabla 51. Sumario de hallazgos histológicos: Dosificación de vanguardia

Hallazgos histológicos	Grupo de tratamiento		
	9	10	11
Inflamación, leucocitos mixtos, subcutánea	6/6*	6/6	6/6
<i>Puntuación de gravedad de grupo media**</i>	1,17	1,17	1,17
Edema, subcutáneo	5/6	6/6	6/6
<i>Puntuación de gravedad de grupo media**</i>	1,50	1,67	1,83
Hemorragia, subcutánea	1/6	3/6	1/6
<i>Puntuación de gravedad de grupo media**</i>	0,17	0,67	0,17
<i>Suma de puntuaciones de gravedad de grupo medias</i>	2,84	3,51	3,17

* Número de secciones afectadas / número de secciones evaluadas

10

** Suma de puntuaciones de gravedad en el grupo dividida entre el número de secciones evaluadas en el grupo

La respuesta a la administración de IG y rHuPH20 era cualitativamente similar en cada grupo de dosis en este estudio. Se caracterizaron estas respuestas mediante inflamación de leucocitos mixta, edema y hemorragia en el tejido subcutáneo en los sitios de inyección. La tabla 52 compara la puntuación gravedad de grupos media en todos los grupos de dosis.

15

Tabla 52. Resumen de las puntuaciones de gravedad de grupos media

Grupo	Tratamiento	Tipo de dosis	Volumen de dosis total (ml)
1	100 ml del 10% de IG	Coformulación	4,50
2	100 ml del 10% de IG / rHuPH20 (50 U/ml)	Coformulación	2,33
3	100 ml del 10% de IG / rHuPH20 (100 U/ml)	Coformulación	2,33
4	100 ml del 10% de IG / rHuPH20 (300 U/ml)	Coformulación	2,67
5	50 ml del 20% de IG	Coformulación	2,17
6	50 ml del 20% de IG / rHuPH20 (50 U/ml)	Coformulación	2,67
7	50 ml del 20% de IG / rHuPH20 (100 U/ml)	Coformulación	2,17
8	50 ml del 20% de IG / rHuPH20 (300 U/ml)	Coformulación	4,34
9	10 ml de rHuPH20 (150 U/ml) + 100 ml del 10% de IG	De vanguardia	2,84
10	20 ml de rHuPH20 (150 U/ml) + 50 ml del 20% de IG	De vanguardia	3,51
11	20 ml de rHuPH20 (150 U/ml) + 50 ml del 20% de IG	De vanguardia	3,17

20

Basándose en las puntuaciones de gravedad de grupos media, las respuestas en el sitio de inyección más graves estaban asociadas con la administración de 100 ml del 10% de IG sola (grupo 1) y con la administración de 50 ml del 20% de IG coformulada con rHuPH20 300 U/ml (grupo 8). La respuesta a la administración de 100 ml del 10% de IG coformulada con rHuPH20 a 50, 100 y 300 U/ml del 10% de IG (grupos 2-4) era similar a la respuesta a la administración de 50 ml del 20% de IG sola (grupo 5), coformulada con rHuPH20 a 50 y 100 U/ml del 20% de IG (grupos 6 y 7), y dosificación de vanguardia con 10 ml de rHuPH20 (150 U/ml) seguido por 100 ml del 10% de IG (grupo 9). Sin embargo, la dosificación de vanguardia con 10 ó 20 ml de rHuPH20 (150 U/ml) seguido por 50 ml del 20% de IG (grupos 10 y 11) dio como resultado una respuesta más grave que coformulaciones similares (grupos 6 y 7). Secciones de piel control contenían pocos hallazgos histológicos, lo que puede atribuirse a la difusión de las formulaciones inyectadas desde los sitios de inyección de artículo de prueba, y hallazgos incidentales no relacionados con las formulaciones.

25

30

F. Resumen

Los resultados confirmaron la viabilidad de dosificar rHuPH20 coformulada con el 10% y el 20% de IG por vía subcutánea en minicerdos del Yucatán. IG (10% o 20%) administrada sola es viable, aunque resultó un grado de moderado a grave de endurecimiento y color rosa/enrojecimiento de la piel. Coformulaciones con rHuPH20 dieron como resultado una disminución en la presión necesaria para lograr las inyecciones, endurecimiento significativamente reducido de la piel y color rosa/enrojecimiento reducido de la piel. El área de formación de ampollas observada era similar o aumentó con todas las formulaciones que contenían rHuPH20 en comparación con la dosificación de IG sola, confirmando una mayor dispersión de los fluidos cuando se utilizó rHuPH20. La dosificación de vanguardia era viable, y se observan presión, color rosa/enrojecimiento y zonas de ampollas similares que con las coformulaciones. Los hallazgos histopatológicos presentes en el tejido subcutáneo profundo atribuidos a la dosificación incluyeron inflamación de leucocitos mixta, edema y hemorragia, estando las respuestas más graves asociadas con la administración del 10% de IG sola y el 20% de IG coformulada con rHuPH20 (300 U/ml).

Lista de secuencias

15 <110> Baxter International, Inc.
Baxter Healthcare, S.A.
Teschner, Wolfgang
Svatos, Sonja

20 Bruckschwaiger, Leopold
Weber, Alfred
Schwarz, Hans-Peter
Lei, Laura

25 <120> COFORMULACIÓN ESTABLE DE HIALURONIDASA E INMUNOGLOBULINA, Y MÉTODOS DE USO DE LA MISMA

<130> 3800020-00137/3088PC

30 <140> Todavía sin asignar
<141> Adjunto en el presente documento

<150> Documento US 61/277.045
<151> 17-09-2009

35 <160> 56

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

40 <210> 1
<211> 509
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <220>
<223> PH20 humana precursora
<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> 474
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
10 <223> PH20 madura

<400> 2
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala

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

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

<220>

<223> rHuPH20 soluble precursor

<400> 3

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

```

Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
      405      410      415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
      420      425      430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
      435      440      445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
      450      455      460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465      470      475      480
Phe Tyr

```

<210> 4
 <211> 447
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> rHuPH20 soluble 1-447

```

10 <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
                435                440                445

```

<210> 5

<211> 446

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-446

10

<400> 5

```

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

```

```

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

```

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

<220>
 <223> rHuPH20 soluble 1-445

```

10 <400> 6
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
  1                      5                      10                      15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
      20                      25                      30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
      35                      40                      45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
      50                      55                      60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                      70                      75                      80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
      85                      90                      95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
      100                      105                      110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
      115                      120                      125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130                      135                      140

```

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

<210> 7

<211> 444

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-444

10

<400> 7

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

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

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

<220>
 <223> rHuPH20 soluble 1-443

<400> 8

```

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

```

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

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-442

<400> 9

```

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

```

5

<210> 10

<211> 450

<212> PRT
<213> *Bos taurus*

<220>
<223> hialuronidasa

5

<400> 10

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

Ser Leu Gly Glu Ser Ala Ala Gln Gly Ala Ala Gly Val Val Leu Trp
 325 330 335
 Val Ser Trp Leu Ser Thr Ser Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile Lys
 340 345 350
 Glu Tyr Val Asp Thr Thr Leu Gly Pro Ser Ile Leu Asn Val Thr Ser
 355 360 365
 Gly Ala Arg Leu Cys Ser Gln Val Leu Cys Ser Gly His Gly Arg Cys
 370 375 380
 Ala Arg Arg Pro Ser Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ile Leu Asn Ser Thr
 385 390 395 400
 Ser Phe Ser Ile Lys Pro Thr Pro Gly Gly Gly Pro Leu Thr Leu Gln
 405 410 415
 Gly Ala Leu Ser Leu Glu Asp Arg Leu Arg Met Ala Val Glu Phe Glu
 420 425 430
 Cys Arg Cys Tyr Arg Gly Trp Arg Gly Thr Arg Cys Glu Gln Trp Gly
 435 440 445
 Met Trp
 450

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

<220>
 <223> PH20

<400> 11
 Met Arg Met Leu Arg Arg His His Ile Ser Phe Arg Ser Phe Ala Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Thr Pro Gln Ala Val Phe Thr Phe Leu Leu Leu Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Ala Leu Asp Phe Arg Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Val Glu Arg Cys Val Asn Arg Arg
 50 55 60
 Phe Gln Leu Pro Pro Asp Leu Arg Leu Phe Ser Val Lys Gly Ser Pro
 65 70 75 80
 Gln Lys Ser Ala Thr Gly Gln Phe Ile Thr Leu Phe Tyr Ala Asp Arg
 85 90 95
 Leu Gly Tyr Tyr Pro His Ile Asp Glu Lys Thr Gly Lys Thr Val Phe
 100 105 110
 Gly Gly Ile Pro Gln Leu Gly Asn Leu Lys Ser His Met Glu Lys Ala
 115 120 125
 Lys Asn Asp Ile Ala Tyr Tyr Ile Pro Asn Asp Ser Val Gly Leu Ala
 130 135 140
 Val Ile Asp Trp Glu Asn Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Gln Lys
 165 170 175
 Asn Pro Gln Leu Ser Phe Pro Glu Ala Ser Lys Ile Ala Lys Val Asp
 180 185 190
 Phe Glu Thr Ala Gly Lys Ser Phe Met Gln Glu Thr Leu Lys Leu Gly
 195 200 205
 Lys Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp
 210 215 220
 Cys Tyr Asn His Asn His Asn Gln Pro Thr Tyr Asn Gly Asn Cys Pro

225					230					235					240
Asp	Val	Glu	Lys	Arg	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Glu	Trp	Leu	Trp	Lys	Glu
				245					250					255	
Ser	Thr	Ala	Leu	Phe	Pro	Ser	Val	Tyr	Leu	Asn	Ile	Arg	Leu	Lys	Ser
			260					265					270		
Thr	Gln	Asn	Ala	Ala	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Gln	Glu	Ala	Ile
		275					280					285			
Arg	Leu	Ser	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Val
	290					295					300				
Tyr	Ala	Arg	Pro	Val	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Gln
305					310					315					320
Gly	Asp	Leu	Val	Asn	Ser	Val	Gly	Glu	Ile	Val	Ser	Leu	Gly	Ala	Ser
				325					330					335	
Gly	Ile	Ile	Met	Trp	Gly	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	Met	Gln	Ser
			340					345					350		
Cys	Met	Asn	Leu	Gly	Thr	Tyr	Leu	Asn	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile
		355					360					365			
Ile	Asn	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	His
	370					375					380				
Asn	Glu	Gly	Val	Cys	Thr	Arg	Lys	His	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu
385					390					395					400
His	Leu	Asn	Pro	Met	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Thr	Gly	Glu	Gly	Gly	Lys
				405					410					415	
Tyr	Thr	Val	Pro	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Gln	Lys	Phe	Ser
			420					425					430		
Asp	Thr	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ile	His	Cys	Lys	Lys	Arg
		435					440					445			
Val	Asp	Ile	Lys	Asn	Val	His	Ser	Val	Asn	Val	Cys	Met	Ala	Glu	Asp
	450					455					460				
Ile	Cys	Ile	Asp	Ser	Pro	Val	Lys	Leu	Gln	Pro	Ser	Asp	His	Ser	Ser
465					470					475					480
Ser	Gln	Glu	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Phe	Ser	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Thr
				485					490					495	
Thr	Thr	Ala	Thr	Val	Ser	Pro	Cys	Thr	Pro	Glu	Lys	His	Ser	Pro	Glu
			500					505					510		
Cys	Leu	Lys	Val	Arg	Cys	Ser	Glu	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Thr	Gln	Lys
		515					520					525			
Ala	Cys	Gln	Ser	Val	Lys	Leu	Lys	Asn	Ile	Ser	Tyr	Gln	Ser	Pro	Ile
	530					535					540				
Gln	Asn	Ile	Lys	Asn	Gln	Thr	Thr	Tyr							
545					550										

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

<220>
 <223> hialuronidasa A

10 <400> 12
 Ser Glu Arg Pro Lys Arg Val Phe Asn Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Met Cys His Gln Tyr Asp Leu Tyr Phe Asp Glu Val Thr Asn Phe
 20 25 30
 Asn Ile Lys Arg Asn Ser Lys Asp Asp Phe Gln Gly Asp Lys Ile Ala
 35 40 45

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

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

<220>
 <223> hialuronidasa B

<400> 13
 Asp Arg Thr Ile Trp Pro Lys Lys Gly Phe Ser Ile Tyr Trp Asn Ile
 1 5 10 15
 Pro Thr His Phe Cys His Asn Phe Gly Val Tyr Phe Lys Glu Leu Lys
 20 25 30
 Gln Phe Asn Ile Lys Tyr Asn Ser Met Asn Asn Phe Arg Gly Glu Thr
 35 40 45
 Ile Ser Leu Phe Tyr Asp Pro Gly Asn Phe Pro Ser Met Val Leu Leu
 50 55 60
 Lys Asn Gly Thr Tyr Glu Ile Arg Asn Glu Gly Val Pro Gln Lys Gly
 65 70 75 80
 Asn Leu Thr Ile His Leu Glu Gln Phe Thr Lys Glu Leu Asp Glu Ile

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

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

<220>
 <223> hialuronidasa

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

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

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

<220>
 <223> hialuronidasa

10

<400> 15
 Ser Glu Arg Pro Lys Arg Val Phe Asn Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Met Cys His Gln Tyr Gly Leu Tyr Phe Asp Glu Val Thr Asn Phe
 20 25 30
 Asn Ile Lys His Asn Ser Lys Asp Asp Phe Gln Gly Asp Lys Ile Ser
 35 40 45
 Ile Phe Tyr Asp Pro Gly Glu Phe Pro Ala Leu Leu Pro Leu Lys Glu
 50 55 60
 Gly Asn Tyr Lys Ile Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Ile
 65 70 75 80
 Thr Ile His Leu Gln Arg Phe Ile Glu Asn Leu Asp Lys Thr Tyr Pro
 85 90 95
 Asn Arg Asn Phe Asn Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Arg

```

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

```

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

<220>
 <223> hialuronidasa

10 <400> 16

```

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

```

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

<210> 17
 <211> 462
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <223> hialuronidasa

10 <400> 17

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

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

<210> 18
 <211> 473
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <223> Hialuronidasa 2

10 <400> 18

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

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

<210> 19

<211> 412

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> hialuronidasa 3

10

<400> 19

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

<210> 20

<211> 435

<212> PRT

5 <213> *Sus scrofa*

<220>

<223> hialuronidasa

10 <400> 20

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

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

<220>

<223> hialuronidasa 3

<400> 21

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

<210> 22

<211> 449

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<223> hialuronidasa 1

<400> 22

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

5

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

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

<220>
 <223> hialuronidasa 2

10 <400> 23
 Met Arg Ala Gly Leu Gly Pro Ile Ile Thr Leu Ala Leu Val Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Ala Trp Ala Ser Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr
 20 25 30
 Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asn Val Pro Thr Gln Glu Cys Ala
 35 40 45
 Pro Arg His Lys Val Pro Leu Asp Leu Arg Ala Phe Asp Val Glu Ala
 50 55 60
 Thr Pro Asn Glu Gly Phe Phe Asn Gln Asn Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asp Arg Leu Gly Leu Tyr Pro Arg Phe Asp Ala Ala Gly Met Ser Val
 85 90 95
 His Gly Gly Val Pro Gln Asn Gly Ser Leu Cys Ala His Leu Pro Met
 100 105 110
 Leu Lys Glu Ala Val Glu Arg Tyr Ile Gln Thr Gln Glu Pro Ala Gly
 115 120 125
 Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Val Trp Val Arg Asn
 130 135 140
 Trp Gln Glu Lys Asp Val Tyr Arg Gln Ser Ser Arg Gln Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Ser Arg His Pro Asp Trp Pro Ser Asp Arg Ile Val Lys Gln Ala Gln
 165 170 175
 Tyr Glu Phe Glu Phe Ala Ala Arg Gln Phe Met Leu Asn Thr Leu Arg

[illegible]

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

<220>
<223> hialuronidasa 3

```

<400> 24
Met Ile Thr Gln Leu Gly Leu Thr Leu Val Val Gly Leu Thr Leu Cys
 1           5           10           15
Leu Val His Val Gln Ala Leu Leu Gln Val Pro Glu Phe Pro Phe Ser
      20           25           30
Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala Arg Cys Lys Thr Arg Phe Gly Val
      35           40           45
His Leu Pro Leu Asp Ala Leu Gly Ile Ile Ala Asn His Gly Gln Arg
      50           55           60
Phe His Gly Gln Asn Ile Thr Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Phe Gly Leu
      65           70           75           80

```

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

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

<220>
 <223> PH20

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

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

			500					505				510					
Val	Ser	Gly	Cys	Leu	Leu	Val	Leu	Cys	Met	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn		
		515					520					525					
Ile	Cys	Tyr	Arg	Leu	Val	Ala	Ile	Gly	Ile	Gln	His	Gly	Tyr	Tyr	Leu		
	530					535					540						

Lys
545

<210> 26
<211> 476
5 <212> PRT
<213> *Ovis aries*

<220>
10 <223> hialuronidasa 2

<400> 26

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

Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Ile Leu Trp Gly Asp Ala Gly Phe
 325 330 335
 Thr Thr Ser Asn Glu Thr Cys Arg Arg Leu Lys Asp Tyr Leu Thr Arg
 340 345 350
 Ser Leu Val Pro Tyr Val Val Asn Val Ser Trp Ala Ala Gln Tyr Cys
 355 360 365
 Ser Trp Ala Gln Cys His Gly His Gly Arg Cys Val Arg Arg Asp Pro
 370 375 380
 Asn Ala His Thr Phe Leu His Leu Ser Ala Ser Ser Phe Arg Leu Val
 385 390 395 400
 Pro Ser His Ala Pro Asp Glu Pro Arg Leu Arg Pro Glu Gly Glu Leu
 405 410 415
 Ser Trp Ala Asp Arg Asn His Leu Gln Thr His Phe Arg Cys Gln Cys
 420 425 430
 Tyr Leu Gly Trp Gly Gly Glu Gln Cys Gln Trp Asp Arg Arg Arg Ala
 435 440 445
 Ala Gly Gly Ala Ser Gly Ala Trp Ala Gly Ser His Leu Thr Gly Leu
 450 455 460
 Leu Ala Val Ala Val Leu Ala Phe Thr Trp Thr Ser
 465 470 475

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

<220>
 <223> secuencia parcial de PH20

10 <400> 27
 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Leu Ser Lys Ile
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr His Arg Pro Val
 20 25 30
 Phe Thr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ser Gln Gly Asp Leu Val Asn
 35 40 45
 Ser Val Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Ile Met Trp
 50 55 60
 Gly Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Met Gln Ser Cys Met Asn Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Tyr Leu Asn Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
 85 90 95
 Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
 100 105 110
 Ile Arg

15 <210> 28
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> *Pongo pygmaeus*

<220>
 20 <223> hialuronidasa 3

<400> 28
 Met Thr Thr Arg Leu Gly Pro Ala Leu Val Leu Gly Val Ala Leu Cys

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

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

<220>
 <223> PH20

<400> 29

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

Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435 440 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460
Ile Asp Ala Ser Leu Lys Pro Pro Val Glu Thr Glu Gly Ser Pro Pro
465 470 475 480
Ile Phe Tyr Asn Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser Thr Thr Met Phe Ile
485 490 495
Val Asn Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
500 505 510

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

<220>
10 <223> PH20

<400> 30
Met Gly Ala Phe Thr Phe Lys His Ser Phe Phe Gly Ser Phe Val Glu
1 5 10 15
Cys Ser Gly Val Leu Gln Thr Val Phe Ile Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Ala Asp Lys Arg Ala Pro Pro Leu Ile Pro Asn Val Pro Leu
35 40 45
Leu Trp Val Trp Asn Ala Pro Thr Glu Phe Cys Ile Gly Gly Thr Asn
50 55 60
Gln Pro Leu Asp Met Ser Phe Phe Ser Ile Val Gly Thr Pro Arg Lys
65 70 75 80
Asn Ile Thr Gly Gln Ser Ile Thr Leu Tyr Tyr Val Asp Arg Leu Gly
85 90 95
Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Pro His Thr Gly Ala Ile Val His Gly Gly
100 105 110
Leu Pro Gln Leu Met Asn Leu Gln Gln His Leu Arg Lys Ser Arg Gln
115 120 125
Asp Ile Leu Phe Tyr Met Pro Thr Asp Ser Val Gly Leu Ala Val Ile
130 135 140
Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Thr Arg Asn Trp Arg Pro Lys
145 150 155 160
Asp Ile Tyr Arg Asn Lys Ser Ile Glu Leu Val Lys Ser Gln His Pro
165 170 175
Gln Tyr Asn His Ser Tyr Ala Val Ala Val Ala Lys Arg Asp Phe Glu
180 185 190
Arg Thr Gly Lys Ala Phe Met Leu Glu Thr Leu Lys Leu Gly Lys Ser
195 200 205
Leu Arg Pro Ser Ser Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr
210 215 220
Asn Thr His Phe Thr Lys Pro Asn Tyr Asp Gly His Cys Pro Pro Ile
225 230 235 240
Glu Leu Gln Arg Asn Asn Asp Leu Gln Trp Leu Trp Asn Asp Ser Thr
245 250 255
Ala Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Val Arg Ser Ser Gln
260 265 270
Asn Gly Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val His Glu Ser Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Leu Met Asp Asp Lys Asn Pro Leu Pro Ile Tyr Val Tyr Ile

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

Leu

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

<220>
 <223> PH20

10

<400> 31
 Met Gly Glu Leu Gln Phe Lys Trp Leu Phe Trp Arg Ser Phe Ala Glu
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Thr Phe Gln Thr Val Leu Ile Phe Leu Phe Ile Pro Tyr
 20 25 30
 Ser Leu Thr Val Asp Tyr Arg Ala Thr Pro Val Leu Ser Asp Thr Thr
 35 40 45
 Phe Val Trp Val Trp Asn Val Pro Thr Glu Ala Cys Val Glu Asn Val
 50 55 60
 Thr Glu Pro Ile Asp Leu Ser Phe Phe Ser Leu Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Lys Thr Ala Ile Gly Gln Pro Val Thr Leu Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Asn Tyr Pro His Ile Asp Ala Gln Gln Thr Glu His His Gly Gly
 100 105 110
 Ile Pro Gln Lys Gly Asp Leu Thr Thr His Leu Val Lys Ala Lys Glu
 115 120 125
 Asp Val Glu Arg Tyr Ile Pro Thr Asp Lys Leu Gly Leu Ala Ile Ile

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

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

<220>
 <223> PH20

<400> 32

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

Ile Lys Ala Lys Val Glu Pro Asn Pro Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Lys Ser Leu Leu Phe Met Thr Thr Leu Gly His Val Leu Tyr His Leu
 485 490 495
 Pro Gln Asp Ile Phe Val Phe Pro Arg Lys Thr Leu Val Ser Thr Pro
 500 505 510

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

<220>
 <223> hialuronidasa

10 <400> 33
 Met Thr Tyr Arg Ile Lys Lys Trp Gln Lys Leu Ser Thr Ile Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Met Ala Gly Val Ile Thr Leu Asn Gly Gly Glu Phe Arg Ser Val
 20 25 30
 Asp Lys His Gln Ile Ala Val Ala Asp Thr Asn Val Gln Thr Pro Asp
 35 40 45
 Tyr Glu Lys Leu Arg Asn Thr Trp Leu Asp Val Asn Tyr Gly Tyr Asp
 50 55 60
 Lys Tyr Asp Glu Asn Asn Pro Asp Met Lys Lys Lys Phe Asp Ala Thr
 65 70 75 80
 Glu Lys Glu Ala Thr Asn Leu Leu Lys Glu Met Lys Thr Glu Ser Gly
 85 90 95
 Arg Lys Tyr Leu Trp Ser Gly Ala Glu Thr Leu Glu Thr Asn Ser Ser
 100 105 110
 His Met Thr Arg Thr Tyr Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ala Glu Ala Met
 115 120 125
 Arg Asn Pro Lys Thr Thr Leu Asn Thr Asp Glu Asn Lys Lys Lys Val
 130 135 140
 Lys Asp Ala Leu Glu Trp Leu His Lys Asn Ala Tyr Gly Lys Glu Pro
 145 150 155 160
 Asp Lys Lys Val Lys Glu Leu Ser Glu Asn Phe Thr Lys Thr Thr Gly
 165 170 175
 Lys Asn Thr Asn Leu Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Lys
 180 185 190
 Ser Leu Thr Asn Thr Leu Ile Leu Leu Asn Asp Gln Phe Ser Asn Glu
 195 200 205
 Glu Lys Lys Lys Phe Thr Ala Pro Ile Lys Thr Phe Ala Pro Asp Ser
 210 215 220
 Asp Lys Ile Leu Ser Ser Val Gly Lys Ala Glu Leu Ala Lys Gly Gly
 225 230 235 240
 Asn Leu Val Asp Ile Ser Lys Val Lys Leu Leu Glu Cys Ile Ile Glu
 245 250 255
 Glu Asp Lys Asp Met Met Lys Lys Ser Ile Asp Ser Phe Asn Lys Val
 260 265 270
 Phe Thr Tyr Val Gln Asp Ser Ala Thr Gly Lys Glu Arg Asn Gly Phe
 275 280 285
 Tyr Lys Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Gln Asp Val Pro Tyr Thr Gly
 290 295 300
 Ala Tyr Gly Val Val Leu Leu Glu Gly Ile Ser Gln Met Met Pro Met
 305 310 315 320
 Ile Lys Glu Thr Pro Phe Asn Asp Lys Thr Gln Asn Asp Thr Thr Leu

				325					330					335			
Lys	Ser	Trp	Ile	Asp	Asp	Gly	Phe	Met	Pro	Leu	Ile	Tyr	Lys	Gly	Glu		
			340					345					350				
Met	Met	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Ala	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Glu	Thr		
		355					360					365					
Ser	His	Ser	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Ser		
	370					375					380						
Asp	Ala	Met	Asp	Asp	Ser	Thr	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Lys	Ile	Val	Lys		
385					390					395					400		
Ser	Ser	Val	Glu	Ser	Asp	Ser	Ser	Tyr	Lys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asn		
				405					410					415			
Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Asp	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Met	Thr	Asp	Asn	Ser		
			420					425					430				
Ile	Ser	Lys	Asn	Gly	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp	Met		
	435						440					445					
Asp	Arg	Val	Thr	Tyr	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu		
	450					455					460						
Ser	Met	Thr	Ser	Lys	Asn	Val	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ser	Ile	Asn	Gly	Glu		
465					470					475					480		
Asn	Leu	Lys	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Asn		
			485						490					495			
Ser	Asp	Val	Lys	His	Tyr	His	Asp	Asn	Phe	Trp	Val	Thr	Ala	Asp	Met		
		500						505					510				
Lys	Arg	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Asp	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	Asp		
	515						520					525					
Thr	Asp	Asp	Lys	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Phe	Val	Gly	Gly	Thr	Lys	Val		
	530					535					540						
Asp	Asp	Gln	His	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Asp	Lys		
545					550					555					560		
Thr	Leu	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val		
			565					570						575			
Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro	Val		
		580						585					590				
Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Thr	Asp		
	595					600						605					
Asp	Lys	Gln	Thr	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Gln	Glu	Asn	Asn	Ser	Val	Phe		
	610				615						620						
Leu	Glu	Ser	Thr	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	Asn		
625					630					635					640		
Lys	Pro	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	Lys		
			645					650						655			
Glu	Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Asp	Thr	Gln	Lys	Thr	Asp	Glu	Tyr	Tyr		
		660					665						670				
Glu	Val	Thr	Gln	Lys	His	Ser	Asn	Ser	Asp	Asn	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Val		
	675					680						685					
Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Asp	Val	Phe	Lys	Thr	Lys	Lys	Asp	Glu		
	690					695					700						
Val	Thr	Val	Val	Lys	Gln	Glu	Asp	Asp	Phe	His	Val	Val	Lys	Asp	Asn		
705					710					715					720		
Glu	Ser	Val	Trp	Ala	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Asn	Ser	Thr	Gln	Thr	Phe		
			725					730						735			
Asp	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Gly	Met	Phe	Ile		
		740						745					750				
Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Asp	Asn	Thr	Tyr	Glu	Cys	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro		
	755					760						765					
Glu	Ser	Thr	Asn	Ser	Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Ile	Ser	Met	Thr		
	770					775						780					
Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly		
	785				790					795					800		
Val	His	Phe	Glu	Leu	Thr	Lys											
					805												

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

5

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 34

```

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

Thr Lys Asp Tyr Val Asp Glu Lys Ile Ala Glu Leu Lys Lys Leu Ile
      355          360          365
Leu Lys Lys
      370

```

10

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

15

<220>

<223> hialuronidasa

5

<400> 35

```

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

```

			340					345					350				
Gly	Ser	Ser	Ala	Gln	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Lys	Ala	Glu	Asp	Asn	Val		
		355					360					365					
Ser	Ile	Val	Met	Thr	Gly	Gly	Arg	Ile	Trp	Gly	Glu	Val	Asp	Glu	Asn		
	370					375					380						
Phe	Ala	Asn	Asn	Phe	Met	Asn	Asn	Ile	Ser	Thr	Glu	Gly	His	Pro	Gly		
385					390					395					400		
Arg	Ala	Pro	Phe	Phe	Trp	Ile	Asn	Trp	Pro	Cys	Ser	Asp	Asn	Ser	Lys		
			405						410					415			
Gln	His	Leu	Ile	Met	Gly	Gly	Asn	Asp	Thr	Phe	Leu	His	Pro	Gly	Val		
		420					425						430				
Asp	Pro	Ser	Lys	Ile	Asp	Gly	Ile	Val	Leu	Asn	Pro	Met	Gln	Gln	Ala		
	435						440					445					
Glu	Ala	Asn	Lys	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Ile	Ala	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn		
	450					455					460						
Ile	Trp	Asp	Asn	Lys	Glu	Glu	Ala	Asp	Glu	Asn	Trp	Asn	Asp	Ser	Phe		
465					470				475						480		
Lys	Tyr	Met	Asp	His	Gly	Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Asn	Ser	Ser	Leu	Ala		
			485					490						495			
Leu	Arg	Glu	Ile	Ser	Lys	His	Met	Ile	Asn	Gln	Asn	Met	Asp	Gly	Arg		
	500						505						510				
Val	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Val	Glu	Leu	Ala	Pro	Lys	Leu	Glu	Ala		
	515					520						525					
Phe	Lys	Gln	Lys	Tyr	Asp	Ser	Gly	Ala	Ser	Ile	Lys	Glu	Asp	Ala	Leu		
	530					535				540							
Glu	Leu	Ile	Ala	Glu	Phe	Thr	Asn	Leu	Gln	Lys	Ala	Ala	Asp	Tyr	Tyr		
545					550					555					560		
Lys	Asn	Asn	Pro	Gly	Asn	Glu	Arg	Thr	Arg	Asp	Gln	Ile	Ile	Tyr	Trp		
			565				570							575			
Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	Asp	Thr	Met	Asp	Ala	Ala	Ile	Gly	Tyr	Leu	Lys		
	580						585						590				
Ser	Ala	Ile	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Asp	Asp	Glu	Ala	Ala	Trp	Ala	Asn		
	595						600					605					
Tyr	Ser	Glu	Ala	Gln	Gly	Ala	Phe	Glu	Lys	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Phe		
	610					615					620						
His	Tyr	Val	Asp	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Glu	Val	Gly	Val	Gln	His	Ile		
625					630					635					640		
Val	Pro	Phe	Ile	Lys	Ser	Met	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Val	Ile	Gly		
			645						650					655			
Ser	Ile	Val	Asp	Pro	Asn	Arg	Ile	Ile	Ala	Thr	Tyr	Ile	Ser	Asn	Arg		
	660						665					670					
Gln	Asp	Ala	Pro	Thr	Gly	Asn	Pro	Asp	Asn	Ile	Phe	Asp	Asn	Asn	Ala		
	675						680					685					
Ser	Thr	Glu	Leu	Val	Tyr	Lys	Asn	Pro	Asn	Arg	Ile	Asp	Val	Gly	Thr		
	690					695					700						
Tyr	Val	Gly	Val	Lys	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ile	Thr	Leu	Asn	Asn	Val	Glu		
705					710					715					720		
Phe	Leu	Met	Gly	Ala	Asn	Ser	Asn	Pro	Asn	Asp	Thr	Met	Gln	Lys	Ala		
			725						730					735			
Lys	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Asp	Gly	Arg	Glu	Trp	Ile	Asp	Leu	Glu	Glu		
		740					745						750				
Gly	Val	Glu	Tyr	Thr	Met	Pro	Gly	Ala	Ile	Lys	Val	Glu	Asn	Leu	Asp		
	755						760					765					
Leu	Lys	Val	Arg	Gly	Val	Arg	Leu	Ile	Ala	Thr	Glu	Ala	Arg	Glu	Asn		
	770					775					780						
Thr	Trp	Leu	Gly	Val	Arg	Asp	Ile	Asn	Val	Asn	Lys	Lys	Glu	Asp	Ser		
785					790					795					800		
Asn	Ser	Gly	Val	Glu	Phe	Asn	Pro	Ser	Leu	Ile	Arg	Ser	Glu	Ser	Trp		

805										810				815			
Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Asn	Glu	Ala	Asn	Leu	Leu	Asp	Gly	Asp	Asp	Asn		
			820					825					830				
Thr	Gly	Val	Trp	Tyr	Lys	Thr	Leu	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Leu	Ala	Gly		
		835					840					845					
Glu	Phe	Ile	Gly	Leu	Asp	Leu	Gly	Lys	Glu	Ile	Lys	Leu	Asp	Gly	Ile		
		850				855					860						
Arg	Phe	Val	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Asp	Lys	Trp	Asn		
865					870					875					880		
Lys	Phe	Lys	Leu	Glu	Tyr	Ser	Leu	Asp	Asn	Glu	Ser	Trp	Thr	Thr	Ile		
				885					890					895			
Lys	Glu	Tyr	Asp	Lys	Thr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly	Lys	Asp	Val	Ile	Glu		
			900					905					910				
Glu	Ser	Phe	Glu	Thr	Pro	Ile	Ser	Ala	Lys	Tyr	Ile	Arg	Leu	Thr	Asn		
		915					920				925						
Met	Glu	Asn	Ile	Asn	Lys	Trp	Leu	Thr	Phe	Ser	Glu	Phe	Ala	Ile	Ile		
		930				935					940						
Ser	Asp	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Gly	Asn	Lys	Glu	Asn	Val	Tyr	Thr	Asn		
945					950					955					960		
Thr	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Asp	Val	Thr	Lys	Leu		
				965					970					975			
Ile	Pro	Thr	Asp	Asp	Ile	Ser	Leu	Asn	His	Gly	Glu	Tyr	Ile	Gly	Val		
			980					985					990				
Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Ile	Asn	Leu	Glu	Ile	Ser		
		995					1000				1005						
Asn	Asp	Thr	Gly	Leu	Lys	Leu	Gln	Ser	Ser	Met	Asn	Gly	Val	Glu	Trp		
		1010				1015					1020						
Thr	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Asn	Thr	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Tyr	Val	Arg		
1025					1030					1035					1040		
Leu	Ile	Asn	Thr	Ser	Asn	Glu	Ala	Val	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Lys	Phe		
				1045					1050					1055			
Glu	Val	Asn	Ser	Asn	Glu	Val	Tyr	Glu	Pro	Ser	Leu	Val	Asp	Ala	Tyr		
			1060					1065					1070				
Val	Gly	Asp	Asp	Gly	Ala	Lys	Lys	Ala	Val	Asp	Gly	Asp	Leu	Lys	Thr		
		1075					1080				1085						
Arg	Val	Lys	Phe	Leu	Gly	Ala	Pro	Ser	Thr	Gly	Asp	Thr	Ile	Val	Tyr		
		1090				1095					1100						
Asp	Leu	Gly	Gln	Glu	Ile	Leu	Val	Asp	Asn	Leu	Lys	Tyr	Val	Val	Leu		
1105					1110					1115					1120		
Asp	Thr	Glu	Val	Asp	His	Val	Arg	Asp	Gly	Lys	Ile	Gln	Leu	Ser	Leu		
				1125					1130					1135			
Asp	Gly	Glu	Thr	Trp	Thr	Asp	Ala	Ile	Thr	Ile	Gly						

1265	1270	1275	1280
Val Thr Ile Val Gln Ser Gly Ser Ser Ile Ser Asn Ala Lys Val Met			
	1285	1290	1295
Ala Arg Val Gly Asp Gly Ser Glu Asn Val Thr Asp Gln Trp Val Gln			
	1300	1305	1310
Leu Gly Thr Leu Ser Asn Ser Leu Asn Glu Phe Ile Asn Arg Asp Tyr			
	1315	1320	1325
Asn Asn Ile Tyr Glu Ile Lys Ile Glu Trp Thr Asp Val Ala Pro Asn			
	1330	1335	1340
Ile Tyr Glu Ile Ile Thr Leu Asn Gln Glu Phe Glu Phe Pro Val Asn			
1345	1350	1355	1360
Asp Ser Leu Lys Ala Lys Tyr Asp Glu Leu Ile Asn Leu Ser Gly Asp			
	1365	1370	1375
Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Phe Glu Thr Leu Lys Glu Ala Leu Asn Glu			
	1380	1385	1390
Ala Lys Ser Ile Leu Asp Asp Ser Asn Ser Ser Gln Lys Lys Ile Asp			
	1395	1400	1405
Lys Ala Leu Glu Lys Leu Asn Lys Ala Glu Glu Arg Leu Asp Leu Arg			
	1410	1415	1420
Ala Thr Asp Phe Glu Asp Phe Asn Lys Val Leu Thr Leu Gly Asn Ser			
1425	1430	1435	1440
Leu Val Glu Glu Glu Tyr Thr Ala Glu Ser Trp Ala Leu Phe Ser Glu			
	1445	1450	1455
Val Leu Glu Ala Ala Asn Glu Ala Asn Lys Asn Lys Ala Asp Tyr Thr			
	1460	1465	1470
Gln Asp Gln Ile Asn Gln Ile Val Ile Asp Leu Asp Ala Ser Ile Lys			
	1475	1480	1485
Ala Leu Val Lys Glu Thr Pro Glu Val Asp Lys Thr Asn Leu Gly Glu			
	1490	1495	1500
Leu Ile Asn Gln Gly Lys Ser Leu Leu Asp Glu Ser Val Glu Gly Phe			
1505	1510	1515	1520
Asn Val Gly Glu Tyr His Lys Gly Ala Lys Asp Gly Leu Thr Val Glu			
	1525	1530	1535
Ile Asn Lys Ala Glu Glu Val Phe Asn Lys Glu Asp Ala Thr Glu Glu			
	1540	1545	1550
Glu Ile Asn Leu Ala Lys Glu Ser Leu Glu Gly Ala Ile Ala Arg Phe			
	1555	1560	1565
Asn Ser Leu Leu Ile Glu Glu Ser Thr Gly Asp Phe Asn Gly Asn Gly			
	1570	1575	1580
Lys Ile Asp Ile Gly Asp Leu Ala Met Val Ser Lys Asn Ile Gly Ser			
1585	1590	1595	1600
Thr Thr Asn Thr Ser Leu Asp Leu Asn Lys Asp Gly Ser Ile Asp Glu			
	1605	1610	1615
Tyr Glu Ile Ser Phe Ile Asn His Arg Ile Leu Asn			
	1620	1625	

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

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

10 <400> 36
 Met Ala Ala His Leu Leu Pro Ile Cys Ala Leu Phe Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15

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

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

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

<400> 37

```

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

```

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

5

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

<400> 38

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

10

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

<220>
 <223> Hialuronidasa-4

10 <400> 39
 Met Lys Val Leu Ser Glu Gly Gln Leu Lys Leu Cys Val Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Val His Leu Thr Ser Trp Leu Leu Ile Phe Phe Ile Leu Lys Ser Ile
 20 25 30
 Ser Cys Leu Lys Pro Ala Arg Leu Pro Ile Tyr Gln Arg Lys Pro Phe
 35 40 45
 Ile Ala Ala Trp Asn Ala Pro Thr Asp Gln Cys Leu Ile Lys Tyr Asn
 50 55 60
 Leu Arg Leu Asn Leu Lys Met Phe Pro Val Ile Gly Ser Pro Leu Ala
 65 70 75 80
 Lys Ala Arg Gly Gln Asn Val Thr Ile Phe Tyr Val Asn Arg Leu Gly
 85 90 95
 Tyr Tyr Pro Trp Tyr Thr Ser Gln Gly Val Pro Ile Asn Gly Gly Leu
 100 105 110
 Pro Gln Asn Ile Ser Leu Gln Val His Leu Glu Lys Ala Asp Gln Asp
 115 120 125
 Ile Asn Tyr Tyr Ile Pro Ala Glu Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile
 130 135 140
 Asp Trp Glu Tyr Trp Arg Pro Gln Trp Ala Arg Asn Trp Asn Ser Lys
 145 150 155 160
 Asp Val Tyr Arg Gln Lys Ser Arg Lys Leu Ile Ser Asp Met Gly Lys
 165 170 175
 Asn Val Ser Ala Thr Asp Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Val Thr Phe Glu
 180 185 190
 Glu Ser Ala Lys Ala Phe Met Lys Glu Thr Ile Lys Leu Gly Ile Lys
 195 200 205
 Ser Arg Pro Lys Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Tyr Pro Asp Cys His
 210 215 220
 Asn Tyr Asn Val Tyr Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Ser Cys Pro Glu Asp
 225 230 235 240
 Glu Val Leu Arg Asn Asn Glu Leu Ser Trp Leu Trp Asn Ser Ser Ala
 245 250 255

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

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

<220>
 <223> sHuPH20 precursor 1-467

10 <400> 40
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140

```

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

```

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

<220>
 <223> sHuPH20 precursor 1-477

10 <400> 41
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro

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

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

$\langle 220 \rangle$

<223> sHuPH20 precursor 1-478

<400> 42

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

```

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

```

<210> 43
 <211> 479
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> sHuPH20 precursor 1-479

10 <400> 43

```

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

```

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

<210> 44
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> sHuPH20 precursor 1-480

<400> 44
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190

Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
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

<210> 45

<211> 481

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> sHuPH20 precursor 1-481

10

<400> 45

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

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

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

<220>
 <223> sHuPH20 precursor 1-483

10 <400> 46

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

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

5

<220>
 <223> sHuPH20 madura 36-467

<400> 47

```

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

10

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

<210> 48

<211> 448

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> sHuPH20 madura 36-483

10

<400> 48

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

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

<210> 49
 <211> 1446
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 10 <223> ADN que codifica rHuPH20 soluble "precursora"

<400> 49
 atgggagtgct taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
 tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
 cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
 cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccgga 240
 ataaacgcca ccgggcaagg tggtacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
 tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
 caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
 ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
 aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
 ctacagaggg cactgagaa agcaaaaaca gaatttgaaa aggcaggga ggatttcctg 600
 gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
 ttcccgattt gttacaacca tcactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
 gtagaaaataa aaagaaatga tgatctcagc tgggttgagg atgaaagcac tgctctttac 780
 ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
 cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
 tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattccttcc tcaagatgaa 960
 cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
 accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
 atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgtct 1140
 tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
 aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
 ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
 ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
 gatgggtgtc gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
 ttctac 1446

<210> 50
 15 <211> 509
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> variante de PH20 P48A

<400> 50

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

```

      370              375              380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385              390              395              400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
      405              410              415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
      420              425              430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
      435              440              445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
      450              455              460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465              470              475              480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
      485              490              495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
      500              505

```

<210> 51

<211> 509

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> variante de PH20 precursora L499W

10

<400> 51

```

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

```

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

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

<220>
10 <223> Vector HZ24

<400> 52
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tgggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccattgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccaacg acccccgcgc attgacgtca ataatacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccagtcgc cccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg ccgccttggc attatgcccc gtacatgacc ttacgggact ttctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggt atgcgggttt ggcagtagac 540
caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc 660
cgccccgttg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720
tcgttttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgcg gtagtttata acagttaaata 780

tgctaacgca	gtcagtgctt	ctgacacaac	agtctcgaac	ttaagctgca	gaagttgggtc	840
gtgaggcact	gggcaggtaa	gtatcaaggt	tacaagacag	gtttaaggag	accaatagaa	900
actgggcttg	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	taggcaccta	ttgggtcttac	960
tgacatccac	tttgcccttc	tctccacagg	tgccactcc	cagttcaatt	acagctctta	1020
aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggctagcatg	ggagtgctaa	aattcaagca	1080
catctttttc	agaagctttg	ttaaatacaag	tggagtatcc	cagatagttt	tcaccttcct	1140
tctgattcca	tgttgcttga	ctctgaattt	cagagcacct	cctgttattc	caaatgtgcc	1200
tttcctctgg	gcctggaatg	cccccaagtga	atttttgtctt	ggaaaatttg	atgagccact	1260
agatatgagc	ctcttctctt	tcataaggaag	ccccgaata	aacgccaccg	ggcaagggtg	1320
tacaatattt	tatgttgata	gacttggtta	ctatctctac	atagattcaa	tcacaggagt	1380
aactgtgaat	ggaggaatcc	cccagaagat	ttccttaca	gaccatctgg	acaaagctaa	1440
gaaagacatt	acattttata	tgccagtaga	caatttgagg	atggctgtta	ttgactggga	1500
agaatggaga	cccacttggg	caagaaactg	gaaaccta	gatgtttaca	agaatagggtc	1560
tattgaattg	gttcagcaac	aaaatgtaca	acttagtctc	acagaggcca	ctgagaaagc	1620
aaaacaagaa	tttggaaagg	cagggaagga	tttcctggta	gagactataa	aattgggaaa	1680
attacttcgg	ccaaatcact	tgtgggggta	ttatcttttt	ccggtattgt	acaaccatca	1740
ctataagaaa	cccggttaca	atggaagttg	cttcaatgta	gaaataaaaa	gaaatgatga	1800
tctcagctgg	ttgtggaatg	aaagcactgc	tctttaccca	tccattttatt	tgaacactca	1860
gcagtcctct	gtagctgcta	cactctatgt	gcgcaatcga	gttcgggaag	ccatcagagt	1920
ttccaaaata	cctgatgcaa	aaagtccact	tccgggtttt	gcataatacc	gcatagtttt	1980
tactgatcaa	gttttgaaat	tcctttctca	agatgaactt	gtgtatacat	ttggcgaaac	2040
tgttgctctg	ggtgcttctg	gaattgtaat	atggggaacc	ctcagtataa	tgcgaagtat	2100
gaaatcttgc	ttgctcctag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
cgtcacacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgctttgc	caggagcaag	gagtgtgtat	2220
aaggaaaaac	tgggaattcaa	gtgactatct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgctattca	2280
acttgagaaa	ggtggaaagt	tcacagtacg	tggaaaaacc	acacttgaag	acctggagca	2340
atthtctgaa	aaattttatt	gcagctgtta	tagcaccttg	agttgtaagg	agaaagctga	2400
tgtaaaagac	actgatgctg	ttgatgtgtg	tattgctgat	ggtgtctgta	tagatgcttt	2460
tctaaaacct	cccatggaga	cagaagaacc	tcaaattttc	tactgaggat	ccatagctaa	2520
cgccctctc	cctccccccc	ccctaactgt	actggccgaa	gccgcttgga	ataaggccgg	2580
tgtgcgtttg	tctatatgtt	atthtccacc	atattgccgt	cttttgccaa	tgtgagggcc	2640
cggaaacctg	gccctgtctt	cttgacgagc	attcctaggg	gtctttcccc	tctcgccaaa	2700
ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ttcttgaaga	2760
caaacaacct	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcggaaac	ccccacctgg	cgacaggtgc	2820
ctctgcggcc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggcggcaca	accccgatgc	2880
cacgtttgtg	gttggaatagt	tgtggaaaga	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgtattcaac	2940
aaggggctga	aggatgccc	gaaggtaccc	cattgtatgg	gatctgatct	ggggcctcgg	3000
tgcacatgct	ttacatgtgt	ttagtcgagg	ttaaaaaac	gtctaggccc	cccgaaccac	3060
ggggacgtgg	ttttcttttg	aaaaacacga	tgataagctt	gccacaaccc	acagcgcccg	3120
ctgccatcat	ggttcgacca	ttgaactgca	tcgtcgccgt	gtcccaaat	atggggattg	3180
gcaagaacgg	agacctaccc	tggcctccgc	tcaggaacga	gttcaagtac	ttccaaagaa	3240
tgaccacaac	ctcttcagt	gaaggtaaac	agaatctggt	gattatgggt	aggaaaacct	3300
ggttctccat	tcctgagaag	aatcgacctt	taaaggacag	aattaatata	gttctcagta	3360
gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	atthtcttgc	caaaagtttg	gatgatgcct	3420
taagacttat	tgaacaaccg	gaattggcaa	gtaaagtcca	catggtttgg	atatcggaag	3480
gcagttctgt	ttaccaggaa	gccatgaatc	aaccaggcca	cctcagactc	tttgtgacaa	3540
ggatcatgca	ggaatttgaa	agtgacacgt	ttttcccaga	aattgatttg	gggaaatata	3600
aacttctccc	agaataccca	ggcgtcctct	ctgagggtcca	ggaggaaaaa	ggcatcaagt	3660
ataagtttga	agtctacgag	aagaaagact	aaacgcgtgg	tacctctaga	gtcgacccgg	3720
gcggccgctt	cgagcagaca	tgataagata	cattgatgag	tttggaacaa	ccacaactag	3780
aatgcagtga	aaaaaatgct	ttatttgtga	aatttgtgat	gctattgctt	tatttgtaac	3840
cattataagc	tgcaataaac	aagttaacaa	caacaattgc	attcatttta	tgtttcaggt	3900
tcagggggag	atgtgggagg	ttttttaaag	caagtaaaac	ctctacaaat	gtgggtaaaat	3960
cgataaggat	ccgggctggc	gtaatagcga	agaggcccg	accgatcgcc	cttcccaaca	4020
gttgcgagc	ctgaatggcg	aatggacgcg	ccctgtagcg	gcgcattaag	cgcggcgggt	4080
gtggtggtta	cgcgcagcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcc	cgtctcttct	4140
gctttcttcc	cttcttttct	cgcacagttc	gcgggttttc	cccgtcaagc	tctaaatcgg	4200
gggctccctt	taggggtccg	atthtagtgc	ttacggcacc	tcgaccccaa	aaaacttgat	4260

```

taggggtgatg gttcacgtag tgggccatcg cectgataga cggtttttctg ccctttgacg 4320
ttggagtgcca cgttcttttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 4380
atctcggtct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttgggttaaaa 4440
aatgagctga ttttaacaaaa atttaacgcg aatttttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
tcctgatgcg gtattttctc cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 4560
ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4620
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 4680
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcacccgc atcaccgaaa cgcgcgagac 4740
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atgggtttctt 4800
agacgtcagg tggcactttt cggggaaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttctt 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttattt cccttttttg 4980
cggcatttttg ccttccctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tccaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat 5160
gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 5220
attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact 5340
tacttctgac aacgatcggg ggaaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 5400
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaaccgacg 5460
agcgtgacac cagatgcct gtagcaatgg caacaacggt 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 acgggggagtc aggcactat ggatgaacga aatagacaga 5760
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5940
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 6000
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat caagagctac 6060
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caaccattca agaactctgt agcaccgcct acataacctc 6180
ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 6240
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt 6300
gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaaag cgcacgcct cccgaaggga gaaaggcgga caggatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctctg gccttttctt 6600
ggccttttgc tcacatggct cgacagatct

```

<210> 53

<211> 186

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> dihidrofolato reductasa

10

<400> 53

```

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

```

```

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

```

<210> 54

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Etiqueta de His

10

<400> 54

His His His His His His

1

5

<210> 55

15 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Etiqueta Flag

<400> 55

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

25 <210> 56

<211> 1449

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

30 <220>

<223> Secuencia de ARNm de Gen2

<400> 56

```

atgggagtg c taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaata aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt cttcttgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gccttttcctc tgggcctgga atgcccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccca 240

```

ataaacgccca	ccgggcaagg	tgttacaata	ttttatgttg	atagacttgg	ctactatcct	300
tacatagatt	caatcacagg	agtaactgtg	aatggaggaa	tccccagaa	gatttcctta	360
caagaccatc	tggacaaagc	taagaaagac	attacatttt	atatgccagt	agacaatttg	420
ggaatggctg	ttattgactg	ggaagaatgg	agaccactt	gggcaagaaa	ctggaaacct	480
aaagatgttt	acaagaatag	gtctattgaa	ttgggttcagc	aacaaaatgt	acaacttagt	540
ctcacagagg	ccactgagaa	agcaaaaacaa	gaatttgaaa	aggcagggaa	ggatttcctg	600
gtagagacta	taaaattggg	aaaattactt	cggccaaatc	acttgtgggg	ttattatcct	660
tttccggatt	gttacaacca	tcactataag	aaacccggtt	acaatggaag	ttgcttcaat	720
gtagaaataa	aaagaaatga	tgatctcagc	tggttgtgga	atgaaagcac	tgctctttac	780
ccatccattt	atttgaacac	tcagcagtct	cctgtagctg	ctacactcta	tggtcgcaat	840
cgagttcggg	aagccatcag	agtttccaaa	atacctgatg	caaaaagtcc	acttccgggt	900
tttgcatata	ccgcatagt	ttttactgat	caagttttga	aattcctttc	tcaagatgaa	960
cttgtgtata	catttggcga	aactgttgct	ctgggtgctt	ctggaattgt	aatatgggga	1020
accctcagta	taatgcgaag	tatgaaatct	tgcttgctcc	tagacaatta	catggagact	1080
atactgaatc	cttacataat	caacgtcaca	ctagcagcca	aaatgtgtag	tcaagtgctt	1140
tgccaggagc	aaggagtgtg	tataaggaaa	aactggaatt	caagtgacta	tcttcacctc	1200
aaccagata	atthtgctat	tcaacttgag	aaaggtggaa	agttcacagt	acgtggaaaa	1260
ccgacacttg	aagacctgga	gcaattttct	gaaaaatttt	attgcagctg	ttatagcacc	1320
ttgagttgta	aggagaaagc	tgatgtaaaa	gacactgatg	ctgttgatgt	gtgtattgct	1380
gatggtgtct	gtatagatgc	ttttctaaaa	cctcccatgg	agacagaaga	acctcaaatt	1440
ttctactga						1449

REIVINDICACIONES

1. Composición estable formulada para administración subcutánea, en la que:
5 la composición estable es una coformulación líquida;
la composición tiene un pH de entre 4 y 5, incluidos; y
la composición comprende:
10 inmunoglobulina (IG) a una concentración que es de al menos el 10% p/v;
una hialuronidasa soluble a una concentración que es de al menos 50 U/ml y está presente en una cantidad
suficiente para permitir la administración subcutánea de la composición en un único sitio de inyección a una
15 velocidad de infusión igual a o mayor que la velocidad de infusión intravenosa para inmunoglobulina
intravenosa; y
una sal de cloruro de metal alcalino a una concentración de al menos 0,05 M,
20 mediante lo cual la coformulación es estable a temperaturas de hasta 32°C durante al menos 6 meses.
2. Composición estable formulada para administración subcutánea, en la que:
la composición estable es una coformulación líquida;
25 la composición tiene un pH de entre 4 y 5, incluidos; y
la composición comprende:
30 inmunoglobulina (IG) a una concentración que es de al menos el 10% p/v;
una hialuronidasa soluble a una concentración que es de al menos 50 U/ml y está presente a una razón de
al menos 100 unidades/gramo (U/g) de IG; y
35 una sal de cloruro de metal alcalino a una concentración de al menos 0,05 M,
mediante lo cual la coformulación es estable a temperaturas de hasta 32°C durante al menos 6 meses.
3. Coformulación líquida, estable según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además un
40 estabilizador de aminoácido en una cantidad que es de al menos 0,1 M, preferiblemente en la que el
estabilizador de aminoácido se selecciona de entre alanina, histidina, arginina, lisina, ornitina, isoleucina,
valina, metionina, glicina y prolina, más preferiblemente, en la que el estabilizador de aminoácido es glicina
o prolina.
4. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el estabilizador de
45 aminoácido es al menos 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M, 0,45 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M o
0,75 M, preferiblemente en la que el estabilizador de aminoácido es 0,25 M.
5. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la IG es al menos el
50 10% p/v, el 11% p/v, el 12% p/v, el 13% p/v, el 14% p/v, el 15% p/v, el 16% p/v, el 17% p/v, el 18% p/v, el
19% p/v, el 20% p/v, el 21% p/v, el 22% p/v o más, preferiblemente en la que la IG es de entre el 10% p/v y
el 20% p/v.
6. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la IG es de plasma
55 humano, preferiblemente en la que la IG se purifica a partir de plasma humano mediante un método de
purificación que comprende fraccionamiento con alcohol, más preferiblemente en la que la IG se purifica
adicionalmente mediante uno cualquiera o más de una precipitación con polietilenglicol (PEG),
cromatografía de intercambio iónico, escisión enzimática, diafiltración o ultrafiltración.
7. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la IG se somete a
60 una etapa de reducción viral seleccionada de entre incubación a pH 4,0 con o sin pepsina, tratamiento con
detergente disolvente y nanofiltración.
8. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la IG contiene IgG,
65 IgA e IgM, preferiblemente en la que la IG contiene más del 95% de IgG.

- 5 9. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la sal de cloruro de metal alcalino se selecciona de entre KCl y NaCl, preferiblemente en la que la sal de cloruro de metal alcalino es NaCl y el NaCl es 0,025 M, 0,03 M, 0,04 M, 0,05 M, 0,08 M, 0,09 M, 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, o 0,25 M, más preferiblemente en la que el NaCl es 0,15 M.
- 10 10. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la hialuronidasa soluble es una PH20, o una forma truncada de la misma, preferiblemente en la que la PH20 selecciona de una PH20 ovina, bovina o humana truncada, más preferiblemente en la que PH20 es una PH20 humana truncada y la PH20 humana truncada se selecciona de entre polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de las mismas.
- 15 11. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la hialuronidasa soluble se designa rHuPH20.
- 20 12. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la hialuronidasa soluble está a una concentración de 50 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml o más, preferiblemente en la que la hialuronidasa soluble está a una concentración de 75 U/ml a 350 U/ml.
- 25 13. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la hialuronidasa soluble está a una razón de 100 U/g de IG, 150 U/g de IG, 200 U/g de IG, 250 U/g de IG, 300 U/g de IG, 400 U/g de IG, 500 U/g de IG, 600 U/g de IG, 700 U/g de IG, 800 U/g de IG, 900 U/g de IG, 1000 U/g de IG, 1200 U/g de IG, 1500 U/g de IG, 1800 U/g de IG, 2000 U/g de IG, 3000 U/g de IG, 4000 U/g de IG o 5000 U/g de IG, preferiblemente en la que la hialuronidasa soluble está a una razón de 250 U/g de IG, 500 U/g de IG, 1000 U/g de IG, 1500 U/g de IG o 3000 U/g de IG.
- 30 14. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que tiene un pH de 4,4 a 4,9 en forma concentrada.
- 35 15. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que la coformulación es para administración de dosificación múltiple o para administración de dosificación individual.
- 40 16. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que la IG está en una cantidad suficiente para administración de dosificación individual para tratar una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG, preferiblemente en la que la cantidad de IG está en una cantidad suficiente para administración de dosificación individual diariamente, semanalmente, bisemanalmente, cada 2-3 semanas, cada 3-4 semanas o mensualmente para el tratamiento de una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG.
- 45 17. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en la que la cantidad de IG en la coformulación es sustancialmente igual que la cantidad en una administración de dosificación individual cuando se administra por vía intravenosa para el tratamiento de una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG.
- 50 18. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en la que la coformulación es para administración de dosificación individual y la cantidad de IG es de al menos 1 gramo (g), 2 g, 3 g, 4 g, 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g o 200 g o es 1-200 g, 1-100 g, 10-100 g, 5-50 g, 6-50 g o 5-100 g.
- 55 19. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la que la coformulación es para administración de dosificación individual y la cantidad de hialuronidasa en la composición es de al menos 500 unidades, 1000 unidades, 2000 unidades, 5000 unidades, 10.000 unidades, 30.000 unidades, 40.000 unidades, 50.000 unidades, 60.000 unidades, 70.000 unidades, 80.000 unidades, 90.000 unidades, 100.000 unidades o más.
- 60 20. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, que es estable a 28°C-32°C durante 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses o más.
21. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que es estable además a 0°C-10°C durante 6 meses, 1 año, 2 años o más.
22. Kit, que comprende la coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, y opcionalmente instrucciones para su uso.
- 65 23. Recipiente, que comprende la coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, preferiblemente en el que el recipiente es un tubo, un frasco, un vial o una jeringa.

24. Recipiente según la reivindicación 23, que comprende además una aguja para inyección.
- 5 25. Recipiente según la reivindicación 23 ó 24, en el que se proporciona la coformulación líquida, estable para administración de dosificación individual o administración de dosificación múltiple.
26. Kit, que comprende el recipiente según cualquiera de las reivindicaciones 23-25, y un medio para infundir la composición.
- 10 27. Uso de una coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-21 para formulación de un medicamento para tratar una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG, preferiblemente en el que la enfermedad o el estado que puede tratarse con IG se selecciona de entre enfermedades de inmunodeficiencia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia secundaria, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias e infecciones agudas.
- 15 28. Coformulación líquida, estable según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un estado que puede tratarse con IG, preferiblemente en el que la enfermedad o el estado que puede tratarse con IG se selecciona de entre enfermedades de inmunodeficiencia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia secundaria, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias e infecciones agudas.
- 20