

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 983**

51 Int. Cl.:

C12N 9/26

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2009** **E 23191930 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024** **EP 4269578**

54 Título: **Composición de hialuronidasa soluble**

30 Prioridad:

06.03.2008 US 6862208 P

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

14.10.2024

73 Titular/es:

HALOZYME, INC. (100.0%)
12390 El Camino Real
San Diego, CA 92130, US

72 Inventor/es:

BAKER, DAVID y
BOOKBINDER, LOUIS

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 981 983 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de hialuronidasa soluble

5 Campo de la invención

Se proporcionan métodos para la producción a gran escala de una proteína humana recombinante.

Antecedentes

Las hialuronidasas son una familia de enzimas que degradan el ácido hialurónico (también conocido como hialuronano o hialuronato), un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Al catalizar la hidrólisis del ácido hialurónico, la hialuronidasa reduce la viscosidad del ácido hialurónico, aumentando de ese modo la permeabilidad tisular. Como tal, las hialuronidasas se han usado, por ejemplo, como agente de difusión o dispersión junto con otros agentes, fármacos y proteínas para potenciar su dispersión y administración. Las hialuronidasas también tienen otros usos terapéuticos y cosméticos. Debido al creciente uso de hialuronidasas para usos terapéuticos y cosméticos, existe la necesidad de cantidades a gran escala de hialuronidasa purificada. Por tanto, entre los objetos en el presente documento, un objeto es proporcionar métodos para la producción y purificación de hialuronidasas.

El documento US 2004/268425 A1 divulga una glicoproteína hialuronidasa soluble (sHASEGP), un procedimiento para la preparación de la misma, usos y composiciones farmacéuticas que comprenden la misma.

Sumario

La invención se define en las reivindicaciones.

En particular, la presente invención se refiere a:

Una composición que comprende una mezcla de polipéptidos, comprendiendo dicha mezcla los polipéptidos expuestos en las SEQ ID NO:4-8, en la que la composición puede obtenerse mediante el siguiente método:

a) inocular medio celular en un biorreactor con un inóculo de células que codifican para PH20 humana recombinante (rHuPH20) soluble para producir un cultivo celular, en el que:

las células comprenden entre 150 y 300 copias de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble;

el biorreactor contiene al menos 100 litros de cultivo celular;

se inoculan 10^{10} - 10^{11} células por 100 litros de cultivo celular; y

las células se cultivan a una temperatura establecida;

b) alimentar las células con un primer medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, insulina humana y extracto de levadura en cantidades suficientes para aumentar el crecimiento celular y la densidad celular máxima y para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 0,5% al 20% del volumen de cultivo celular;

c) alimentar las células con un segundo medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble e inducir la detención del ciclo celular; y

reducir la temperatura en comparación con la temperatura en la etapa a) hasta una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en el que:

la cantidad de L-alanil-L-glutamina se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina en la etapa b);

la cantidad de extracto de levadura se aumenta en comparación con la cantidad de extracto de levadura en la etapa b); y

el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 0,5% al 20% del volumen de cultivo celular;

d) alimentar las células con un tercer medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble y aumentar la detención del ciclo celular; y

reducir la temperatura en comparación con la temperatura en la etapa c) hasta una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en el que:

la cantidad de L-alanil-L-glutamina se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina en la etapa c);

las cantidades de extracto de levadura, glucosa y butirato de sodio se aumentan en comparación con las cantidades de extracto de levadura, glucosa y butirato de sodio en la etapa c); y

el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 0,5% al 20% del volumen de cultivo celular;

e) alimentar las células con un cuarto medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble y aumentar la detención del ciclo celular, y

reducir la temperatura en comparación con la temperatura en la etapa d) hasta una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en el que:

la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa en la etapa d);

la cantidad de butirato de sodio se reduce en comparación con la cantidad de butirato de sodio en la etapa d); y

el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 0,5% al 20% del volumen de cultivo celular;

f) continuar cultivando las células hasta que la viabilidad disminuye por debajo de al menos el 50%;

g) obtener el líquido de cultivo celular de recogida; y

h) purificar la rHuPH20 a partir del líquido de cultivo celular de recogida,

en la que la rHuPH20 soluble es una forma soluble de PH20 humana que se expresa de manera recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO).

En el presente documento se proporcionan métodos para la producción y purificación de rHuPH20 soluble. Los métodos no se reivindican como tal. En el presente documento también se proporcionan un medio celular y un líquido de cultivo celular recogido que contienen rHuPH20 soluble. Los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para producir y purificar cualquier cantidad de rHuPH20 soluble. Por ejemplo, los métodos y las etapas descritos en el presente documento pueden modificarse para aumentar o disminuir la escala, tal como resultaría evidente para un experto en la técnica.

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para producir y purificar cantidades a gran escala de rHuPH20 soluble. Los métodos proporcionados en el presente documento para producir rHuPH20 soluble pueden incluir a) inocular medio celular en un biorreactor con un inóculo de células que codifican para rHuPH20 soluble para producir un cultivo celular, en el que las células contienen entre 150 y 300 copias de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble, el biorreactor contiene al menos 100 litros de cultivo celular y se inoculan aproximadamente 10^{10} - 10^{11} células por 100 litros de cultivo celular y las células se cultivan a una temperatura establecida; b) alimentar las células con un primer medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, insulina humana y extracto de levadura en cantidades suficientes para aumentar el crecimiento celular y la densidad celular máxima y para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular; c) alimentar las células con un segundo medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble e inducir la detención del ciclo celular, en el que la cantidad de L-alanil-L-glutamina se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina en la segunda etapa y la cantidad de extracto de levadura se aumenta en comparación con la cantidad de extracto de levadura en la etapa b), y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular y la temperatura se reduce en comparación con la temperatura en la etapa a) hasta una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; d) alimentar las células con un tercer medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble y aumentar la detención del ciclo celular, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular, la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa en la etapa c), y la cantidad de extracto de levadura y butirato de sodio se aumenta en comparación con la cantidad de extracto de levadura y butirato de sodio en la etapa c) y la temperatura se reduce en comparación con la temperatura en la etapa c) hasta una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; e) alimentar las células con un cuarto medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble y

aumentar la detención del ciclo celular, en el que la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa en la etapa d), la cantidad de butirato de sodio se reduce en comparación con la cantidad de butirato de sodio en la etapa d), la temperatura se reduce en comparación con la temperatura en la etapa d) hasta una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular; f) cultivar las células hasta que la viabilidad disminuye por debajo de al menos o aproximadamente el 50%; g) obtener el líquido de cultivo celular de recogida; y h) la rHuPH20 soluble se purifica a partir del líquido de cultivo de recogida.

El líquido de cultivo celular de recogida puede filtrarse antes de la purificación. En algunos ejemplos, la temperatura en la etapa a) es de 37°C, la temperatura en la etapa c) es de 36,5°C, la temperatura en la etapa d) es de 36°C y la temperatura en la etapa d) es de 35,5°C. La purificación de rHuPH20 soluble puede efectuarse mediante cromatografía en columna, tal como cromatografía en columna de agarosa reticulada con perlas, cromatografía en columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas, cromatografía en columna de boronato de aminofenilo y cromatografía en columna de hidroxipatita.

En un ejemplo, el método para producir rHuPH20 soluble incluye las etapas de a) inocular medio celular en un biorreactor con un inóculo de células que codifican para rHuPH20 soluble para producir un cultivo celular, en el que las células contienen entre 150 y 300 copias de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble, el biorreactor contiene al menos 100 litros de cultivo celular, la densidad celular de inoculación es de o de aproximadamente 4×10^5 células/ml y las células se cultivan a 37°C; b) alimentar las células con un primer medio de alimentación que contiene o que contiene aproximadamente 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 32 mM, 16,6 g/l de extracto de levadura y 33 mg/l de insulina, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular; c) alimentar las células con un segundo medio de alimentación que contiene o que contiene aproximadamente 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 16 mM, 33,4 g/l de extracto de levadura y 0,92 g/l de butirato de sodio, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular y la temperatura se reduce hasta 36,5°C; d) alimentar las células con un tercer medio de alimentación que contiene o que contiene aproximadamente 50 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 10 mM, 50 g/l de extracto de levadura y 1,8 g/l de butirato de sodio, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular y la temperatura se reduce hasta 36°C; e) alimentar las células con un cuarto medio de alimentación que contiene o que contiene aproximadamente 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 6,6 mM, 50 g/l de extracto de levadura y 0,92 g/l de butirato de sodio, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular y la temperatura se reduce hasta 36°C; f) continuar cultivando las células hasta que la viabilidad disminuye por debajo de al menos o aproximadamente el 50%; g) obtener el líquido de cultivo celular de recogida; h) filtrar el líquido de cultivo celular de recogida; e i) purificar la rHuPH20 a partir del líquido de cultivo de recogida usando cromatografía en columna de agarosa reticulada con perlas, cromatografía en columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas, cromatografía en columna de boronato de aminofenilo y cromatografía en columna de hidroxipatita.

En otro ejemplo, el método para producir rHuPH20 soluble incluye las etapas de a) inocular medio celular en un biorreactor con un inóculo de células que codifican para rHuPH20 soluble para producir un cultivo celular, en el que las células comprenden entre 150 y 300 copias de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble; el biorreactor contiene al menos 100 litros de cultivo celular; la densidad celular de inoculación es de o de aproximadamente 4×10^5 células/ml; y las células se cultivan a o a aproximadamente 37°C; b) alimentar las células con un primer medio de alimentación que contiene o que contiene aproximadamente 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 32 mM, 83,3 g/l de extracto de levadura y 33 mg/l de insulina, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% o aproximadamente el 4% del volumen de cultivo celular; c) alimentar las células con un segundo medio de alimentación que contiene o que contiene aproximadamente 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 13 mM, 166,7 g/l de extracto de levadura y 0,92 g/l de butirato de sodio, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen de o de aproximadamente el 4% del volumen de cultivo celular y la temperatura se reduce hasta 36,5°C; d) alimentar las células con un tercer medio de alimentación que contiene o que contiene aproximadamente 50 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 10 mM, 250 g/l de extracto de levadura y 1,8 g/l de butirato de sodio, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% o aproximadamente el 4% del volumen de cultivo celular y la temperatura se reduce hasta 36°C; e) alimentar las células con un cuarto medio de alimentación que contiene o que contiene aproximadamente 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 6,7 mM, 250 g/l de extracto de levadura y 0,92 g/l de butirato de sodio, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% o aproximadamente el 4% del volumen de cultivo celular y la temperatura se reduce hasta 36°C; f) continuar cultivando las células hasta que la viabilidad disminuye por debajo de al menos o aproximadamente el 50%; g) obtener el líquido de cultivo celular de recogida; h) filtrar el líquido de cultivo celular de recogida; e i) purificar la rHuPH20 a partir del líquido de cultivo de recogida usando cromatografía en columna de agarosa reticulada con perlas, cromatografía en columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas, cromatografía en columna de boronato de aminofenilo y cromatografía en columna de hidroxipatita.

En algunos ejemplos, el volumen de cultivo celular en el biorreactor es o es aproximadamente de 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 ó 3500 litros. En algunos ejemplos, la cantidad de rHuPH20 soluble que se produce por 100 l de cultivo celular usando los métodos proporcionados en el presente documento es de al menos o

aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ó 40 gramos de rHuPH20 soluble. La actividad específica de la rHuPH20 soluble puede ser de al menos o aproximadamente 80000, 100000, 120000, 140000, 160000 ó 180.000 unidades/mg. Las células que codifican para rHuPH20 soluble pueden ser, en algunos casos, células CHO DG44. Además, la rHuPH20 puede estar codificada por el ácido nucleico expuesto en SEQ ID NO:47.

En el presente documento se proporcionan medios de cultivo celular que contienen rHuPH20 soluble con una actividad enzimática mayor de 5000 unidades/ml, tal como 10.000, 12.000, 14.000, 16.000, 18.000, 20.000, 22.000 ó 24.000 unidades/ml. En el presente documento también se proporciona un líquido de cultivo celular recogido que contiene rHuPH20 soluble con una actividad enzimática mayor de 5000 unidades/ml, tal como 10.000, 12.000, 14.000, 16.000, 18.000, 20.000, 22.000 ó 24.000 unidades/ml. Sin embargo, la invención reivindicada se refiere a la composición tal como se define en las reivindicaciones 1 a 16. Por tanto, también en la siguiente sección de descripción detallada, los métodos, los usos terapéuticos, las células que expresan hialuronidasa, la expansión de cultivo celular, etc., son útiles para entender la invención, pero no se reivindican como tal.

Descripción detallada

Esquema

- A. Definiciones
- B. Visión general
- C. Hialuronidasa
 - 1. Estructura y función
 - 2. PH20
 - 3. Usos terapéuticos de las hialuronidasas
 - a. Uso como agente de difusión
 - b. Uso en hipodermóclisis
 - c. Uso en vitrectomía y en trastornos y estados oftálmicos
 - d. Uso en terapia génica
 - e. Usos cosméticos
 - f. Uso en el trasplante de órganos
 - g. Uso en el tratamiento del cáncer
 - h. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicanos en el cerebro
 - i. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicanos en enfermedad cardiovascular
 - j. Uso en enfermedad pulmonar
 - k. Otros usos
- D. Células que expresan hialuronidasa
 - a. Células 3D35M
 - b. Células 2B2
- E. Expansión del cultivo celular
- F. Producción de proteína
- G. Concentración de proteína e intercambio del tampón
- H. Purificación

1. Columna de agarosa reticulada con perlas
2. Columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas
3. Columna de boronato de aminofenilo
4. Columna de hidroxipatita
6. Eliminación de virus, concentración de proteína e intercambio del tampón

I. Llenado

J. Monitorización y ensayos

1. Condiciones de monitorización

2. Monitorización de la producción de rHuPH20 soluble

K. Ejemplos

A. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece(n) la(s) invención/inventores.

En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos en el presente documento, prevalecerán aquellas en esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y que la información particular en Internet puede aparecer y desaparecer, pero puede encontrarse información equivalente buscando en Internet. La referencia a los mismos evidencia la disponibilidad y difusión pública de tal información.

Tal como se usa en el presente documento, hialuronidasa se refiere a una enzima que degrada el 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 no limitadas a, murina, canina, felina, leporina, aviar, bovina, ovina, porcina, equina, piscina, ranina, bacteriana y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas no humanas a modo de ejemplo incluyen hialuronidasas de vacas (SEQ ID NO:10), avispa chaqueta amarilla (SEQ ID NO:11 y 12), abeja melífera (SEQ ID NO:13), avispa de cara blanca (SEQ ID NO:14), avispa de papel (SEQ ID NO:15), ratón (SEQ ID NO:16-18, 29), cerdo (SEQ ID NO:19-20), rata (SEQ ID NO:21-23, 28), conejo (SEQ ID NO:24), oveja (SEQ ID NO:25), orangután (SEQ ID NO:26), macaco cangrejero (SEQ ID NO:27), cobaya (SEQ ID NO:30), *Staphylococcus aureus* (SEQ ID NO:31), *Streptococcus pyogenes* (SEQ ID NO:32) y *Clostridium perfringens* (SEQ ID NO:33). Las hialuronidasas humanas a modo de ejemplo incluyen HYAL1 (SEQ ID NO:34), HYAL2 (SEQ ID NO:35), HYAL3 (SEQ ID NO:36), HYAL4 (SEQ ID NO:37) y PH20 (SEQ ID NO:1). Entre las hialuronidasas también se incluyen 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 incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme y otras variantes.

Por ejemplo, la referencia a hialuronidasa también incluye las variantes de polipéptido precursor de PH20 humana expuestas en las SEQ ID NO:48-49. Las hialuronidasas también incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas ni postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluyen polipéptidos maduros que carecen de la totalidad o de una porción del sitio de unión a glicosilfosfatidil inositol (GPI) en el extremo C-terminal, de tal manera que, tras la expresión, los polipéptidos son soluble. Los polipéptidos de sHuPH20 a modo de ejemplo incluyen polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO:4-9 y 45-46. Los polipéptidos precursores para tales polipéptidos de sHuPH20 a modo de ejemplo incluyen una secuencia señal. Ejemplos de precursores son aquellos expuestos en las SEQ ID NO:3 y 38-44 que contienen, cada uno, una secuencia señal de 35 aminoácidos en las posiciones de aminoácido 1-35. Los polipéptidos de HuPH20 soluble también incluyen aquellos degradados durante o después de los métodos de producción y purificación descritos en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, rHuPH20 soluble se refiere a una forma soluble de PH20 humana que se expresa de manera recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO). La rHuPH20 soluble está codificada por un ácido nucleico que incluye la secuencia señal y se expone en SEQ ID NO:47. 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. Cuando 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 o más de las SEQ ID NO:4-8 en diversas abundancias. También se incluyen las variantes alélicas correspondientes.

Tal como se usa en el presente documento, "células que expresan rHuPH20 soluble" se refiere a cualquier célula CHO que expresa rHuPH20 soluble. Las células que expresan rHuPH20 soluble a modo de ejemplo incluyen células 2B2 y 3D35M. Las células que expresan rHuPH20 soluble son células CHO en las que se ha introducido un ácido nucleico que contiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO:55.

Tal como se usa en el presente documento, actividad hialuronidasa se refiere a cualquier actividad mostrada por un polipéptido de hialuronidasa. Tales actividades pueden someterse a prueba *in vitro* y/o *in vivo* e incluyen, pero no se limitan a, actividad enzimática, tal como para efectuar la escisión del ácido hialurónico, capacidad para actuar como agente de difusión o dispersión y antigenicidad. La actividad hialuronidasa se refiere a cualquier actividad mostrada por un polipéptido de hialuronidasa.

Tal como se usa en el presente documento, actividad enzimática se refiere a la actividad de una hialuronidasa, tal como se evalúa en ensayos enzimáticos *in vitro*, para escindir un sustrato, tal como ácido hialurónico. Los ensayos *in vitro* para determinar la actividad enzimática de las hialuronidasas, tales como rHuPH20 soluble, se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Los ensayos a modo de ejemplo incluyen el ensayo de microturbidez descrito a continuación (véase, por ejemplo, el ejemplo 9 y la sección I) que mide indirectamente la escisión de ácido hialurónico mediante hialuronidasa detectando el precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico sin escindir se une con albúmina sérica.

Tal como se usa en el presente documento, actividad específica con referencia a una rHuPH20 soluble es la actividad enzimática en relación con la cantidad de rHuPH20 soluble. La actividad específica se calcula dividiendo la actividad enzimática (unidades/ml) entre la concentración de proteína (mg/ml).

Tal como se usa en el presente documento, "muestra al menos una actividad" o "conserva al menos una actividad" se refiere a la actividad mostrada por una rHuPH20 soluble variante en comparación con cualquier rHuPH20 soluble expuesta en las SEQ ID NO:4-9 en las mismas condiciones. Normalmente, una rHuPH20 soluble variante que conserva o muestra al menos una actividad de una rHuPH20 soluble expuesta en las SEQ ID NO:4-9 conserva la actividad de una rHuPH20 soluble expuesta en las SEQ ID NO:4-9 del o aproximadamente del 0,5%, el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500% o más. Las actividades a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, actividad hialuronidasa y actividad enzimática.

Tal como se usa en el presente documento, cromatografía en columna de agarosa reticulada con perlas se refiere a cromatografía usando una columna empaquetada con agarosa reticulada con perlas. Un ejemplo de agarosa reticulada con perlas es Q Sepharose™.

Tal como se usa en el presente documento, cromatografía en columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas se refiere a cromatografía usando una columna empaquetada con agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas. Un ejemplo de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas es Phenyl Sepharose™.

Tal como se usa en el presente documento, cromatografía en columna de boronato de aminofenilo se refiere a cromatografía usando una columna empaquetada con agarosa de boronato de aminofenilo.

Tal como se usa en el presente documento, cromatografía en columna de hidroxipatita se refiere a cromatografía usando una columna empaquetada con hidroxipatita.

Tal como se usa en el presente documento, líquido de cultivo celular recogido o líquido de cultivo celular de recogida (HCCF) se refiere al líquido obtenido tras la recogida de las células a partir del biorreactor y la separación del medio de cultivo celular a partir de las células, del residuo celular y de otros agregados. El cultivo celular que se recoge del biorreactor puede filtrarse para clarificar el cultivo, retirar las células, el residuo celular y otros agregados para dejar el líquido de cultivo celular recogido.

Tal como se usa en el presente documento, densidad celular se refiere al número de células en un volumen de medio dado.

Tal como se usa en el presente documento, cultivo celular o cultivo se refiere a una población de células que está suspendida en un medio en condiciones adecuadas para mantener la viabilidad de las células o hacer crecer a las células.

Tal como se usa en el presente documento, medio, medio celular o medio de cultivo celular se refiere a una disolución que contiene nutrientes suficientes para fomentar el crecimiento de las células en un cultivo. Normalmente, estas disoluciones contienen aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y/u oligoelementos. El medio también puede contener complementos adicionales, tales como hormonas, factores de crecimiento e inhibidores del crecimiento. La referencia a medio de cultivo celular incluida

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 hallados en la naturaleza que se incorporan en la proteína mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm relacionado en humanos.

Tal como se usa en el presente documento, “en cantidades suficientes para aumentar”, cuando hace referencia a una sustancia que aumenta parámetros tales como la tasa de crecimiento celular, densidad celular máxima, síntesis de proteína o detención del ciclo celular, se refiere a la cantidad de una sustancia que efectúa un aumento de uno de estos parámetros en comparación con lo observado en ausencia de la sustancia. Los parámetros pueden evaluarse en presencia y ausencia de una sustancia, y puede determinarse la cantidad de sustancia que aumenta el parámetro (tal como la tasa de crecimiento celular, densidad celular máxima, síntesis de proteína o detención del ciclo celular) en comparación con en ausencia de la sustancia. La tasa de crecimiento, densidad celular máxima, síntesis de proteína o detención del ciclo celular en presencia de la sustancia puede aumentar en o en aproximadamente el 0,5%, el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 100%, el 200%, el 300%, el 400%, el 500% o más en comparación con la tasa de crecimiento, densidad celular máxima, síntesis de proteína o detención del ciclo celular en ausencia de la sustancia.

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 monocatenarios o bicatenarios. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcados, tal como con un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente o radiomarcador, se contemplan las moléculas monocatenarias. Tales moléculas tienen normalmente una longitud de tal manera que su diana es estadísticamente única o tiene un bajo número de copias (normalmente menor de 5, generalmente menor de 3) para sondear o cebar una librería. En general, una sonda o un cebador contiene al menos 14, 16 ó 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas y los cebadores pueden tener una longitud de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos.

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

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 de una letra (tabla 1). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones convencionales de una 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 los fines en el presente documento, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos que se producen de manera natural, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en los el 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 de ese modo, pueden estar sustituidos 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. De acuerdo con la nomenclatura convencional de polipéptidos descrita en J. Biol. Chem., 243: 3552-3559 (1969) y adoptada en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, las abreviaturas para los residuos de aminoácido se muestran en la tabla 1:

Tabla 1 - Tabla de correspondencia

SÍMBOLO		
1 letra	3 letras	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 mediante fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de extremo amino-terminal a extremo carboxilo-terminal. Además, la expresión "residuo de aminoácido" se define ampliamente para incluir los aminoácidos enumerados en la tabla de correspondencia (tabla 1) y aminoácidos modificados e inusuales, tales como aquellos a los que se hace referencia en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822. Además, debe indicarse que un guion al principio 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 se producen en los 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. Por tanto, los aminoácidos que no se producen de manera natural incluyen, 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 D-isoestereómeros de aminoácidos. En el presente documento se describen aminoácidos no naturales a modo de ejemplo y que conocen los expertos en la técnica.

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

Tal como se usa en el presente documento, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la semejanza 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 las 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, se alinean dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos de una manera que se 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 cierta medida las secuencias de nucleótidos, también pueden tener en cuenta diferencias conservativas y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias

conservativas son aquellas que conservan las propiedades fisicoquímicas de los residuos implicados. Las alineaciones pueden ser globales (alineación de las secuencias comparadas en toda la longitud de las secuencias e incluyendo todos los residuos) o locales (alineación de una porción de las secuencias que incluye sólo la región o las regiones más similar(es)).

"Identidad" por sí misma 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. y Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

Tal como se usa en el presente documento, homóloga (con respecto a secuencias de ácido nucleico y/o de aminoácidos) significa aproximadamente mayor de o igual al 25% de homología de secuencia, normalmente mayor de o igual al 25%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95% de homología de secuencia; si fuese necesario, puede especificarse el porcentaje preciso. Para los 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 las secuencias de modo que se obtiene el apareamiento 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, el número de aminoácidos conservados se determina por medio de programas de algoritmos de alineación convencionales, y pueden usarse con las penalizaciones de hueco por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas se hibridarían normalmente con rigurosidad moderada o rigurosidad alta en 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 en hibridación.

Si cualesquiera dos moléculas tienen secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que son al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% "idénticas" u "homólogas" 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 programa GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12(I):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al.*, J Molec Biol 215:403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo *et al.* (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por ejemplo, puede usarse la función BLAST de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica para determinar la identidad. Otros programas disponibles comercial o públicamente incluyen, el programa "MegAlign" de DNASTar (Madison, WI) y el programa "Gap" del Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin (UWG) (Madison WI). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de 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, revisado 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 identidades y 0 para 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 adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización para los 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 "el 90% idéntica a" se refiere a identidades en porcentaje de desde el 90 hasta el 99,99% con respecto a la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de referencia del polipéptido. La identidad a un nivel del 90% o más es indicativa del hecho de que, suponiendo con 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 cada 100) de los aminoácidos en el polipéptido de prueba difieren de los del polipéptido de referencia. Pueden realizarse comparaciones similares entre polinucleótidos de prueba y de referencia. Tales diferencias pueden representarse como mutaciones puntuales distribuidas al azar en toda la longitud de un polipéptido o pueden estar agrupadas en una o más ubicaciones de longitud variable hasta el máximo permitido, por ejemplo, una diferencia de 10/100 aminoácidos (aproximadamente el 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácido nucleico o aminoácidos. Al nivel de homologías o identidades superiores a aproximadamente el 85-90%, el resultado debe ser

independiente del programa y de los parámetros de hueco establecidos; tales altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, a menudo mediante alineación manual sin depender de un software.

Tal como se usa en el presente documento, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos. Normalmente, se alinean dos o más secuencias que están relacionadas con una identidad de un 50% o más. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que se alinean en posiciones correspondientes, y puede incluir la alineación de secuencias derivadas de ARN, tales como EST y otros ADNc, alineadas con una secuencia 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 nucleósidos trifosfato 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 unas determinadas moléculas de ácido nucleico pueden servir como "sonda" y como "cebador". Un cebador, sin embargo, tiene un grupo 3'-hidroxilo para la extensión. Un cebador puede usarse en una variedad de métodos, incluyendo, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR con transcriptasa inversa (RT), PCR de ARN, LCR, PCR múltiple, PCR angosta ("*panhandle PCR*"), PCR de captura, PCR de expresión, 3' y 5' RACE, PCR *in situ*, PCR mediada por ligación y otros protocolos de amplificación.

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 mediante mutación, y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico dentro de poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar para polipéptidos que tienen alterada la secuencia de aminoácidos. 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 una forma predominante de un polipéptido a partir de una población o un miembro individual de referencia de una especie. Normalmente, las variantes alélicas, que incluyen variantes interespecie y intraespecie, tienen normalmente al menos el 80%, el 90% o más de identidad de aminoácidos con una forma de tipo natural y/o predominante de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y de si la comparación es interespecie o intraespecie. En general, las variantes alélicas intraespecie tienen al menos aproximadamente el 80%, el 85%, el 90% o el 95% o más de identidad con una forma de tipo natural y/o predominante, incluyendo el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más de identidad con una forma de tipo natural y/o predominante de un polipéptido. En general, la referencia a una variante alélica en el presente documento se refiere a variaciones en proteínas entre los 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 porciones del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o la misma posición en cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigótico para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigótico para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un solo nucleótido o en 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 refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, 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, modificación se refiere a la modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o de una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico, e incluye deleciones, inserciones y reemplazos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Los métodos de modificación de un polipéptido son rutinarios para los expertos en la técnica, tales como el uso de metodologías de ADN recombinante.

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

Tal como se usa en el presente documento, polipéptido o proteína, o porción biológicamente activa de los mismos, aislado o purificado está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o del tejido del que se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Puede determinarse que las preparaciones están sustancialmente libres si parecen estar 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 suficientemente puras de tal manera que la purificación adicional no alteraría de manera detectable las propiedades físicas y químicas de la sustancia, tales como las actividades enzimática y biológica. Los expertos en la técnica conocen métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancial y químicamente puros. Sin embargo, un compuesto sustancial y químicamente puro puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, una 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 se separa a partir 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 o menos de aproximadamente el 20%, el 10% o el 5% del volumen de la preparación de proteínas enzimáticas.

Tal como se usa en el presente documento, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas incluye preparaciones de proteínas enzimáticas en las que la proteína se separa a partir de los precursores químicos u otras sustancias químicas 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 sustancias químicas o componentes no enzimáticos.

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

Tal como se usa en el presente documento, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que está unido operativamente con secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras y, opcionalmente, pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación y similares. En general, los vectores de expresión se derivan de ADN plasmídico 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, un virus recombinante u otro vector que, tras la 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 aquellos que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y aquellos que permanecen episómicos o aquellos que se integran en el genoma de las células huésped.

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

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

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 sustancia acuosa, una sustancia no acuosa o cualquier combinación de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, un kit es una combinación envasada que opcionalmente incluye otros elementos, tales como reactivos adicionales e instrucciones para el uso de la combinación o los elementos del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, "enfermedad o trastorno" se refiere a un estado patológico en un organismo resultante de una causa o estado que incluye, pero sin limitarse a, infecciones, estados adquiridos, estados genéticos, y está caracterizado por síntomas identificables.

Tal como se usa en el presente documento, "tratar" a 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 abarca la profilaxis, terapia y/o cura.

Profilaxis se refiere a la prevención de una posible enfermedad y/o a la prevención del empeoramiento de los síntomas

o la progresión de una enfermedad. Tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de un interferón modificado y de las 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, fármacos 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 se mejoran o alteran de otro modo de manera beneficiosa los síntomas de un estado, un trastorno o una enfermedad u otra indicación.

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

Tal como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz es la cantidad de un agente terapéutico 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, animal incluye cualquier animal, tal como, pero no se limitan a, primates incluyendo humanos, gorilas y monos; roedores tales como ratones y ratas; aves de corral tales como gallinas; rumiantes tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; ovinos tales como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen a los humanos como animal contemplado. La mayoría de las enzimas son de origen animal, incluyendo de origen mamífero.

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 que 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.

Tal como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "uno/una" y "el/la" incluyen los 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.

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

Tal como se usa en el presente documento, las abreviaturas para los grupos protectores, aminoácidos y cualquier otro compuesto, a menos que se indique lo contrario, según su uso habitual, son abreviaturas reconocidas o según la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (véase, (1972) Biochem. 11:1726).

B. Visión general

En el presente documento se proporcionan métodos para la producción a gran escala de rHuPH20 soluble. Los métodos utilizan biorreactores para cultivar células que producen la rHuPH20 soluble, específicamente células CHO (por ejemplo, células CHO DG44). Ejemplos de tales células son células 2B2 que producen rHuPH20 soluble. El volumen de cultivo celular en el biorreactor normalmente es de o de aproximadamente 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 ó 3500 litros. Antes de la inoculación del biorreactor, las células se expanden a través de una serie de volúmenes crecientes de cultivo celular para generar el número requerido de células para la siembra del biorreactor. El cultivo celular en el biorreactor se inocula con 10^{10} - 10^{11} por 100 litros de cultivo celular. Después se incuban las células en el biorreactor durante 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más días.

Durante esta incubación, se añaden medios de alimentación al cultivo celular para suministrar nutrientes y complementos adicionales. Los complementos o nutrientes a modo de ejemplo que pueden incluirse en los medios de alimentación incluyen, pero no se limitan a, glucosa, glutamina o sustituto de glutamina, tal como L-alanil-L-glutamina, insulina y butirato de sodio. El tipo y la cantidad de complemento añadido pueden influir en el crecimiento celular y en la producción de proteína. Por ejemplo, la insulina y el sustituto de glutamina se incorporan en el primer medio de alimentación añadido al cultivo celular para aumentar el crecimiento celular y la densidad celular máxima. Los medios de alimentación posteriores se diseñan para fomentar más la producción de proteína que el crecimiento celular. Los complementos tales como la insulina se excluyen y los complementos tales como sustituto de glutamina, tal como L-alanil-L-glutamina, se reducen en cantidad. En cambio, los complementos tales como el extracto de levadura que potencian la síntesis de proteína se aumentan en cantidad. Además, también se incluye butirato de sodio que potencia la detención del ciclo celular y, por tanto, aumenta la producción de proteína.

Tras la producción de proteína en el biorreactor, se recogen las células y se concentra la rHuPH20 soluble, que se ha secretado en los medios de cultivo celular, antes del inicio del procedimiento de purificación. Después se purifica la rHuPH20 soluble a partir de la disolución concentrada de proteínas usando una serie de etapas de purificación. Métodos de purificación a modo de ejemplo que se usan para los métodos en el presente documento es una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de afinidad. Después se concentra la proteína purificada y se somete a diafiltración.

Utilizando los métodos descritos en el presente documento, se producen entre aproximadamente 0,5-50 gramos de rHuPH20 soluble por 100 l de cultivo celular. En algunos ejemplos, la cantidad de rHuPH20 soluble producida por 100 l de cultivo es de o de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30 ó 40 gramos o más. En algunos ejemplos, el rendimiento de rHuPH20 soluble tras la purificación puede oscilar entre o entre aproximadamente el 10% y el 50% de la cantidad producida antes de la purificación. Por ejemplo, el rendimiento tras la purificación puede ser de o de aproximadamente el 10%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45% o el 50% de la cantidad producida antes de la purificación. En general, la actividad específica de rHuPH20 soluble producida usando los métodos en el presente documento es de al menos o aproximadamente 80000, 100000, 120000, 140000, 160000 ó 180.000 unidades/mg.

C. Hialuronidasas

Las hialuronidasas son una familia de enzimas que degradan el ácido hialurónico (también conocido como hialuronano o hialuronato), un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Al catalizar la hidrólisis del ácido hialurónico, la hialuronidasa reduce la viscosidad del ácido hialurónico, aumentando de ese modo la permeabilidad tisular. Como tal, las hialuronidasas se han usado, por ejemplo, como agente de difusión o dispersión junto con otros agentes, fármacos y proteínas para potenciar su dispersión y administración.

1. Estructura y función de las hialuronidasas

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*-acetilhexosaminidasas que hidrolizan el enlace glicosídico $\beta 1 \rightarrow 4$ del ácido hialurónico en oligosacáridos de diversas longitudes, tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Tienen actividades tanto hidrolíticas como transglicosidasas y pueden degradar el ácido hialurónico y los sulfatos de condroitina, tales como C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas de vacas (SEQ ID NO:10), avispa chaqueta amarilla (SEQ ID NO:11 y 12), abeja melífera (SEQ ID NO:13), avispa de cara blanca (SEQ ID NO:14), avispa de papel (SEQ ID NO:15), ratón (SEQ ID NO:16-18, 29), cerdo (SEQ ID NO:19-20), rata (SEQ ID NO:21-23, 228), conejo (SEQ ID NO:24), oveja (SEQ ID NO:25), orangután (SEQ ID NO:26), macaco cangrejero (SEQ ID NO:27), cobaya (SEQ ID NO:30) y hialuronidasas humanas.

Hay seis genes similares a hialuronidasa en el genoma humano: HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 y PH20/SPAM1. HYALP1 es un pseudogén y no se ha demostrado que HYAL3 (SEQ ID NO:36) posea actividad enzimática frente a ninguna de los sustratos conocidos. HYAL4 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO:37) es una condroitinasa y muestra poca actividad frente al ácido hialurónico. HYAL1 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO:34) es la enzima activa ácida prototípica y PH20 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO:1) es la enzima activa neutra prototípica. En general, las hialuronidasas activas ácidas, tales como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO:35) carecen de actividad catalítica a pH neutro (es decir, pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* por encima de pH 4,5 (Frost *et al.* (1997) Anal Biochemistry 251:263-269). HYAL2 es una enzima activa ácida con una actividad específica muy baja *in vitro*. Las enzimas similares a hialuronidasa también pueden estar caracterizadas por aquellas que generalmente están fijadas a la membrana plasmática mediante un ancla de glicosilfosfatidil inositol, tales como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, *et al.* (2003) Proc Natl Acad Sci USA. 100(8):4580-5) y aquellas que generalmente son solubles, tales como HYAL1 humana (Frost *et al.* (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1):10-5). Al catalizar la hidrólisis del ácido hialurónico, un constituyente principal de la barrera intersticial, la hialuronidasa reduce la viscosidad del ácido hialurónico, aumentando de ese modo la permeabilidad tisular. También se ha demostrado que muestra actividades antineoplásicas y anticarcinogénicas.

La glicosilación ligada a N de algunas hialuronidasas puede ser muy importante para su actividad catalítica y estabilidad. Aunque la alteración del tipo de glicano que modifica una glicoproteína puede tener efectos drásticos sobre la antigenicidad, el plegamiento estructural, la solubilidad y la estabilidad de una proteína, se cree que muchas enzimas no requieren glicosilación para una actividad enzimática óptima. Por tanto, las hialuronidasas son únicas en este aspecto, en que la eliminación de glicosilación ligada a N puede dar como resultado una inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. Para tales hialuronidasas, la presencia de glicanos ligados a N es crítica para generar una enzima activa.

Hay siete posibles sitios de glicosilación ligada 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 central de hialuronidasa. Sin embargo, se requieren cisteínas adicionales en el extremo carboxilo-terminal para una actividad catalítica enzimática neutra de tal manera que los aminoácidos 36 a 464 de SEQ ID NO:1 contienen el dominio de hialuronidasa PH20 humana mínimamente activo. Por tanto, no se requiere el sitio de glicosilación ligada a N N490 para una actividad hialuronidasa apropiada.

Los oligosacáridos ligados a N se dividen en varios tipos principales (de oligomanosa, complejos, híbridos, sulfatados), teniendo todos ellos núcleos de (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc unidos a través del nitrógeno de amida de los residuos de

Asn que se encuentran dentro de las secuencias -Asn-Xaa-Thr/Ser- (donde Xaa no es Pro). Se ha notificado la glicosilación en un sitio -Asn-Xaa-Cys- para la de proteína C de coagulación. En algunos casos, la hialuronidasa puede contener enlaces tanto N-glicosídicos como O-glicosídicos. Por ejemplo, rHuPH20 (tal como se produce en los métodos descritos en el presente documento) tiene oligosacáridos ligados a O así como oligosacáridos ligados a N.

Los métodos descritos en el presente documento proporcionan un procedimiento para la producción y purificación de grandes cantidades de una preparación soluble de preparación de hialuronidasa PH20 humana.

2. PH20

La PH20 humana (también conocida como proteína de superficie del espermatozoide PH20), tal como se indicó anteriormente, es la enzima activa neutra prototípica que generalmente está fijada a la membrana plasmática mediante un ancla de glicosilfosfatidil inositol (GPI). Está implicada de manera natural en la adhesión espermatozoide-óvulo y ayuda a que el espermatozoide penetre en la capa de células del cúmulo digiriendo el ácido hialurónico. El transcrito de ARNm de PH20 se traduce normalmente para generar una proteína precursora de 509 aminoácidos que contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos en el extremo N-terminal (posiciones de residuo de aminoácido 1-35). Por tanto, el polipéptido de PH20 maduro es un polipéptido de 474 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2.

Las formas solubles de PH20 humana (sHuPH20) pueden producirse y purificarse usando los métodos descritos en el presente documento. La generación de sHuPH20 se describe en las solicitudes de patente estadounidense relacionadas n.ºs 10/795.095, 11/065.716 y 11/238.171 (también denominada en estas solicitudes sHASEGP o rHuPH20) y en los ejemplos 1 y 4 a continuación. Las formas solubles se producen expresando el ácido nucleico que codifica para los truncamientos C-terminales del polipéptido de PH20 maduro que carecen de los sitios de unión a GPI. La forma soluble de PH20 humana, rHuPH20, se produce y purifica usando los métodos proporcionados en el presente documento.

3. Usos terapéuticos de las hialuronidasas

Se han preparado y aprobado diversas formas de hialuronidasas para uso terapéutico en humanos. Por ejemplo, las preparaciones de hialuronidasa derivadas de animales incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada, y Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular bovina. Hylenex® (Halozyme Therapeutics) es una hialuronidasa recombinante humana producida por células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas por ingeniería genética que contienen ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble. Los usos terapéuticos aprobados para la hialuronidasa incluyen el uso como adyuvante para aumentar la absorción y dispersión de otros fármacos inyectados, para hipodermoclisis (administración subcutánea de líquidos) y como adyuvante en urografía subcutánea para mejorar la resorción de agentes radiopacos. Además de estas indicaciones, las hialuronidasas, incluyendo sHuPH20, pueden usarse como agente terapéutico o cosmético para el tratamiento de enfermedades y estados adicionales.

Tal como se indicó anteriormente, la hialuronidasa es una sustancia de difusión o propagación que modifica la permeabilidad del tejido conjuntivo a través de la hidrólisis del ácido hialurónico, un polisacárido encontrado en la sustancia intercelular fundamental del tejido conjuntivo, y de determinados tejidos especializados, tales como el cordón umbilical y el humor vítreo. Cuando no está presente ningún factor de difusión, los materiales inyectados por vía subcutánea, tales como fármacos, proteínas, péptidos y ácido nucleico, se difunden muy lentamente. La inyección conjunta con hialuronidasa, sin embargo, puede provocar una rápida difusión. La velocidad de propagación es proporcional a la cantidad de enzima, y el grado de propagación es proporcional al volumen de disolución. La absorción y dispersión de fármacos y agentes inyectados pueden potenciarse añadiendo 10-1000 unidades de hialuronidasa a la disolución de inyección. En algunos ejemplos, se añaden 150 U de hialuronidasa. Las hialuronidasas tienen múltiples usos, incluyendo y además de su uso como agente de difusión. La hialuronidasa se usa comúnmente, por ejemplo, para el bloqueo peribulbar en anestesia local antes de cirugía oftálmica. La presencia de la enzima evita la necesidad de bloqueos adicionales y acelera el tiempo hasta el inicio de la acinesia (pérdida de movimiento del ojo). El bloqueo peribulbar y sub-Tenon son las aplicaciones más comunes de hialuronidasa para procedimientos oftálmicos. La hialuronidasa también puede fomentar la acinesia en cirugía cosmética, tal como blefaroplastias y estiramientos faciales. A continuación, se describen usos terapéuticos y cosméticos a modo de ejemplo para hialuronidasa.

a. Uso como agente de difusión

La rHuPH20 soluble producida usando los métodos descritos en el presente documento puede usarse para fomentar o potenciar la administración de agentes y moléculas a cualquiera de una variedad de tejidos de mamífero *in vivo*. Puede usarse para facilitar la propagación y, por tanto, fomentar la administración de agentes farmacológicos de molécula pequeña así como agentes farmacológicos de molécula más grande, tales como proteínas, ácidos nucleicos y ácidos ribonucleicos, y composiciones macromoleculares que pueden contener una combinación de componentes incluyendo, pero no limitados a, ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, moléculas basadas en lípidos y fármacos. Por ejemplo, las moléculas y los complejos macromoleculares que oscilan desde aproximadamente 10 nm

hasta aproximadamente 500 nm de diámetro pueden mostrar mejoras drásticas en la administración a través de espacios intersticiales cuando el espacio intersticial se ha expuesto previamente, o de manera coincidente, a hialuronidasa (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente estadounidense n.ºs 10/795.095, 11/065.716 y 11/238.171).

Los ejemplos de agentes y moléculas farmacéuticos, terapéuticos y cosméticos que pueden administrarse con rHuPH20 incluyen, pero no se limitan a, anestésicos; antimetabolitos, antineoplásicos y otros agentes contra el cáncer; antivirales; antiinfecciosos, incluyendo antibacterianos y otros antibióticos, antifúngicos y otros antiinfecciosos; agentes inmunomoduladores; antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos; betabloqueantes; simpatomiméticos; ducosanoides, prostaglandinas y análogos de prostaglandinas; mióticos, colinérgicos y anticolinesterasas; antialérgicos y descongestionantes; agentes hormonales; factores de crecimiento; inmunosupresores; vacunas y toxoides; sueros inmunitarios; anticuerpos; y cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, se administra rHuPH20 soluble con una catepsina, tal como catepsina L.

b. Uso en hipodermóclisis

La hipodermóclisis, la infusión de líquidos y electrolitos en la hipodermis de la piel, es una técnica de hidratación útil y sencilla adecuada para pacientes adultos con una deshidratación de ligera a moderada, especialmente los ancianos. Aunque se considera segura y eficaz, el efecto adverso más frecuente es el edema subcutáneo leve que puede tratarse mediante masaje local o diuréticos sistémicos. Pueden administrarse aproximadamente 3 l en un periodo de 24 horas en dos sitios independientes. Los sitios de infusión comunes incluyen el pecho, el abdomen, los muslos y la parte superior de los brazos. Las disoluciones usadas en la hipodermóclisis incluyen, por ejemplo, solución salina normal, solución salina seminormal, glucosa con solución salina y glucosa al 5%. También puede añadirse cloruro de potasio a la disolución. La adición de hialuronidasa a la disolución puede potenciar la absorción de líquidos y aumentar la velocidad global de administración.

c. Uso en vitrectomía y en trastornos y estados oftálmicos

La hialuronidasa puede usarse para minimizar el desprendimiento o desgarro de la retina durante la vitrectomía. Esto podría provocar, por ejemplo, que el cuerpo vítreo se desacople o "desinserte" de la retina, antes de la extracción del cuerpo vítreo. Tal desinserción o desacoplamiento del cuerpo vítreo puede minimizar la probabilidad de que se produzca un desgarro o desprendimiento adicional de la retina a medida que se retira el cuerpo vítreo.

La hialuronidasa puede usarse para diversas aplicaciones oftálmicas, incluyendo la aplicación complementaria de vitrectomía descrita en la patente estadounidense n.º 5.292.509. El uso de una hialuronidasa altamente purificada, tal como rHuPH20 soluble producida y purificada mediante los métodos descritos en el presente documento, es preferible para procedimientos intraoculares para minimizar la inmunogenicidad y la toxicidad. En algunos ejemplos, puede usarse una hialuronidasa pegilada para prolongar la residencia dentro del cuerpo vítreo y prevenir la captación localizada.

Las hialuronidasas pueden usarse para tratar y/o prevenir trastornos oftálmicos, por ejemplo, previniendo la neovascularización y aumentando la velocidad de aclaramiento a partir del cuerpo vítreo de materiales tóxicos para la retina. La hialuronidasa puede administrarse en una cantidad eficaz para licuar el humor vítreo del ojo sin provocar daño tóxico al ojo. La licuefacción del humor vítreo aumenta la velocidad de intercambio de líquido desde la cámara vítrea. Este aumento en el intercambio elimina los materiales contaminantes cuya presencia puede provocar daño oftalmológico y retiniano.

La hialuronidasa también puede usarse para reducir la presión posoperatoria. El ácido hialurónico se ha usado en el ojo principalmente como espaciador durante procedimientos quirúrgicos de cataratas y lentes intraoculares. También se usa en otros procedimientos quirúrgicos oculares tales como glaucoma, cirugía vítrea y retiniana y en trasplante de córnea. Un efecto secundario común que se produce en pacientes posoperatorios de cataratas es un aumento significativo temprano, y ocasionalmente prolongado, de la presión intraocular. Un estado de este tipo es a veces grave, especialmente en pacientes con cambios glaucomatosos en la papila óptica. La hialuronidasa puede administrarse conjuntamente con ácido hialurónico en el ojo antes de la cirugía para reducir la presión posoperatoria en el ojo. La hialuronidasa se administra en una cantidad eficaz para reducir la presión intraocular a niveles preoperatorios descomponiendo el ácido hialurónico sin disminuir su eficacia durante la cirugía ni provocar efectos secundarios en el paciente (patente estadounidense n.º 6.745.776).

La hialuronidasa también puede administrarse a pacientes con glaucoma para eliminar glicosaminoglicanos de la malla trabecular y reducir la presión intraocular, y puede aplicarse al cuerpo vítreo para fomentar la resolución de hemorragias vítreas (es decir, extravasación de sangre al cuerpo vítreo), que puede producirse en relación con estados tales como retinopatía diabética, neovascularización retiniana, oclusión de la vena retiniana, desprendimiento de vítreo posterior, lágrimas retinianas, traumatismos oculares, y similares. La presencia de hemorragias vítreas, que son normalmente lentas de resolver, puede retrasar o impedir procedimientos que requieren que la retina se visualice a través del cuerpo vítreo para el diagnóstico y/o para procedimientos de tratamiento tales como fotocoagulación con láser y similares que son a menudo tratamientos primarios para estados tales como retinopatía

diabética proliferativa.

d. Uso en terapia génica

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

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

e. Usos cosméticos

- 25 Las hialuronidasas pueden administrarse para eliminar glicosaminoglicanos implicados en la acumulación de celulitis y para fomentar el flujo linfático. En algunos ejemplos, se usan hialuronidasas humanas, tales como, por ejemplo, rHuPH20 soluble, para el tratamiento de la celulitis. La hialuronidasa puede administrarse a través de inyecciones subcutáneas repetidas, a través de administración transdérmica en forma de pomadas o cremas o a través del uso de formulaciones inyectables de liberación lenta para fomentar la degradación continua de glicosaminoglicanos y prevenir su retorno.

- La hialuronidasa también puede usarse para tratar estados tales como edema de "piel de cerdo" o edema de "piel de naranja". Las hialuronidasas pueden efectuar la despolimerización de las cadenas largas de mucopolisacáridos que pueden acumularse en la dermis y que son responsables de la retención de agua unida y de la ralentización, por compresión capilar, de la propagación de líquidos orgánicos, que eliminan desechos metabólicos. Tal retención de agua y residuos asociados con la sobrecarga de grasa de los lipocitos constituye el edema de "piel de cerdo" o el edema de "piel de naranja" clásicos. La despolimerización puede cortar las cadenas largas de mucopolisacáridos en cadenas más cortas, dando como resultado la eliminación del agua unida y los desechos y el restablecimiento de la circulación venosa y linfática, culminando en la desaparición de edema local.

f. Uso en el trasplante de órganos

- El contenido de ácido hialurónico en un órgano puede aumentar con la inflamación. Se ha observado una concentración aumentada de ácido hialurónico en tejido de diferentes órganos caracterizados por lesión inflamatoria-inmunitaria tal como alveolitis (Nettelbladt *et al.* (1991) Am. Resp. Dis. 139: 759-762) e infarto de miocardio (Waldenstrom *et al.* (1991) J. Clin. Invest. 88(5): 1622-1628). Otros ejemplos incluyen rechazo de aloinjerto después de un trasplante renal (Ha'llgren *et al.* (1990) J. Exp. Med. 171: 2063-2076; Wells *et al.* (1990) Transplantation 50: 240-243), de intestino delgado (Wallander *et al.* (1993) Transplant. Int. 6: 133-137) o cardíaco (Haellgren *et al.* (1990) J Clin Invest 185:668-673); o una inflamación miocárdica de origen viral (Waldenstrdm *et al.* (1993) Eur. J. Clin. Invest. 23: 277-282). La aparición de edemas intersticiales en relación con el injerto de un órgano constituye un problema grave en el campo de la cirugía de trasplante. Los injertos con edemas intersticiales pueden hincharse hasta tal punto que la función se pierde temporalmente. En algunos casos, la hinchazón puede provocar la ruptura del riñón, lo que da como resultado una hemorragia masiva. Las hialuronidasas pueden usarse para degradar glicosaminoglicanos acumulados en un trasplante de órgano. La eliminación de tales glicosaminoglicanos fomenta la retirada de agua del injerto y, por tanto, potencia la función del órgano.

g. Uso en el tratamiento de cáncer

- La hialuronidasa tiene efectos anticancerígenos directos. La hialuronidasa previene el crecimiento de tumores trasplantados a ratones (De Maeyer *et al.*, (1992) Int. J. Cancer 51:657-660) e inhibe la formación de tumores tras la exposición a carcinógenos (Pawellowski *et al.* (1979) Int. J. Cancer 23:105-109). La hialuronidasa es eficaz como único agente terapéutico en el tratamiento del cáncer cerebral (gliomas) (documento WO 198802261). Además de estos efectos, las hialuronidasas también pueden usarse para potenciar la penetración de agentes quimioterápicos en tumores sólidos. Pueden inyectarse por vía intratumoral con agentes antineoplásicos o por vía intravenosa para cánceres diseminados o tumores difíciles de alcanzar. El agente antineoplásico puede ser un agente quimioterápico, un anticuerpo, un péptido o un vector, virus o ADN de terapia génica. Adicionalmente, la hialuronidasa puede usarse

para reclutar células tumorales en el agrupamiento cíclico para la sensibilización en tumores previamente quimiorresistentes que han adquirido resistencia a múltiples fármacos (St. Croix *et al.*, (1998) Cancer Lett, septiembre 131 (1): 35-44). Las hialuronidasas, tales como, por ejemplo, rHuPH20 soluble, también pueden potenciar la administración de productos biológicos tales como anticuerpos monoclonales, citocinas y otros fármacos a tumores que acumulan glicosaminoglicanos.

Las hialuronidasas también pueden usarse para aumentar la sensibilidad de los tumores que son resistentes a la quimioterapia convencional. Por ejemplo, la hialuronidasa, tal como rHuPH20 soluble, puede administrarse a un paciente que tiene un tumor asociado con un defecto de HYAL1 en una cantidad eficaz para aumentar la propagación alrededor del sitio del tumor (por ejemplo, para facilitar la circulación y/o las concentraciones de agentes quimioterápicos en y alrededor del sitio del tumor), inhibir la motilidad de las células tumorales, tal como mediante degradación del ácido hialurónico, y/o para reducir el umbral de apoptosis de las células tumorales. Esto puede llevar la(s) célula(s) tumoral(es) a un estado de anoikis, que hace que la célula tumoral sea más susceptible a la acción de agentes quimioterápicos. La administración de hialuronidasa puede inducir la capacidad de respuesta de tumores previamente resistentes a la quimioterapia del páncreas, el estómago, el colon, los ovarios y la mama (Baumgartner *et al.* (1988) Reg. Cancer Treat. 1:55-58; Zanker *et al.* (1986) Proc. Amer. Assoc. 27:390).

En un ejemplo, se usan hialuronidasas en el tratamiento de cánceres metastásicos y no metastásicos, incluyendo aquellos que tienen actividad hialuronidasa endógena reducida en relación con células no cancerosas. Las hialuronidasas pueden usarse como agente quimioterápico solas o en combinación con otros agentes quimioterápicos. Los cánceres a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células escamosas y cánceres de mama, ovario, cabeza y cuello, o cualquier otro cáncer asociado con niveles deprimidos de actividad hialuronidasa o catabolismo reducido del ácido hialurónico.

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

Los niveles de ácido hialurónico son elevados en varios estados patológicos cefalorraquídeos. Los niveles de ácido hialurónico cefalorraquídeo son normalmente menores de 200 µg/l en adultos (Laurent *et al.* (1996) Acta Neurol Scand septiembre 94(3):194-206), pero pueden elevarse hasta niveles de más de 8000 µg/l en enfermedades tales como meningitis, estenosis del conducto vertebral, traumatismo craneal e infarto cerebral. Las hialuronidasas, tales como, por ejemplo, rHuPH20 soluble, pueden utilizarse para degradar niveles críticamente elevados de sustrato.

La falta de vasos linfáticos efectivos en el cerebro también puede conducir a edemas potencialmente mortales tras un traumatismo craneal. La acumulación de ácido hialurónico es un resultado de la síntesis aumentada por las ácido hialurónico sintetas y la degradación reducida. La acumulación de ácido hialurónico puede servir inicialmente para el propósito beneficioso de aumentar el contenido de agua en el tejido dañado para facilitar la extravasación de leucocitos, pero la acumulación continuada puede ser mortal. La administración de hialuronidasa, tal como por vía intratecal o intravenosa, a un paciente que padece traumatismo craneal puede servir para retirar la acumulación de ácido hialurónico tisular y el agua asociada con la misma.

Las hialuronidasas también pueden usarse en el tratamiento de edema asociado con tumores cerebrales, particularmente el asociado con glioblastoma multiforme. El edema asociado con tumores cerebrales resulta de la acumulación de ácido hialurónico en las porciones no cancerosas del cerebro adyacentes al tumor. La administración de hialuronidasa a los sitios de acumulación de ácido hialurónico (por ejemplo, mediante inyección intravenosa o mediante una derivación) puede aliviar el edema asociado con tales neoplasias malignas degradando el exceso de ácido hialurónico en estos sitios.

i. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicanos en enfermedad cardiovascular

La hialuronidasa puede usarse en el tratamiento de alguna enfermedad cardiovascular. La administración de hialuronidasa en modelos animales tras infarto de miocardio experimental puede reducir el tamaño del infarto (Macleay *et al.* (1976) Science 194(4261): 199-200). Un mecanismo propuesto por el cual puede producirse esto es reduciendo la acumulación de ácido hialurónico que se produce tras reperusión isquémica. Se cree que la reducción del tamaño del infarto se produce a partir de un drenaje linfático aumentado y una oxigenación tisular aumentada y la reducción del contenido de agua miocárdica.

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

j. Uso en enfermedad pulmonar

Los niveles de ácido hialurónico en lavados broncoalveolares (BAL) de individuos normales están generalmente por debajo de 15 ng/ml. Sin embargo, los niveles de ácido hialurónico en BAL aumentan drásticamente en condiciones de insuficiencia respiratoria (Bjermer *et al.* (1987) Br Med J (Clin Res Ed) 295 (6602):803-6). El ácido hialurónico aumentado en el pulmón puede prevenir la propagación de oxígeno y el intercambio de gases, así como activar las

respuestas de neutrófilos y macrófagos. Las preparaciones purificadas de rHuPH20 soluble, tales como las producidas usando los métodos proporcionados en el presente documento, pueden administrarse o bien mediante administración pulmonar o bien mediante administración intravenosa a pacientes que presentan tales estados para reducir los niveles de hialuronano. Las hialuronidasas también pueden administrarse a pacientes que padecen otras complicaciones pulmonares que están asociadas con glicosaminoglicanos elevados o para potenciar la administración de otras moléculas administradas conjuntamente al pulmón.

k. Otros usos

En ejemplos adicionales de su uso terapéutico, la hialuronidasa puede usarse para propósitos tales como un antídoto para la necrosis local a partir de la inyección paravenosa de sustancias necróticas tales como alcaloides de la vinca (Few *et al.* (1987) *Amer. J. Matern. Child Nurs.* 12, 23-26), tratamiento de quistes ganglionares (Paul *et al.* (1997) *J Hand Surg.* 22 (2): 219-21) y tratamiento de necrosis tisular debida a insuficiencia venosa (Elder *et al.* (1980) *Lancet* 648-649). Las hialuronidasas también pueden usarse para tratar quistes ganglionares (también conocidos como quiste de muñeca, quiste bíblico o quiste de tendón dorsal), que son la masa de tejido blando más común de la mano y son sacos llenos de líquido que pueden sentirse debajo de la piel.

Las hialuronidasas pueden usarse en el tratamiento de lesión de la médula espinal degradando proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG). Tras una lesión de la médula espinal, los astrocitos producen cicatrices gliales que contienen CSPG. Los CSPG desempeñan un papel crucial en la inhibición del crecimiento axonal. Además, se ha demostrado que la expresión de CSPG aumenta tras la lesión del sistema nervioso central (SNC). Las hialuronidasas también pueden utilizarse para el tratamiento de hernias de disco en un proceso conocido como quimionucleólisis. La condroitinasa ABC, una enzima que escinde sustratos similares a la hialuronidasa, puede inducir la reducción de la presión intradiscal en la columna lumbar. Existen tres tipos de lesiones de los discos. Un disco sobresaliente es uno que está intacto pero abultado. En un disco extruido, la envoltura fibrosa se ha desgarrado y el NP se ha exudado, pero todavía está conectado al disco. En un disco secuestrado, un fragmento del NP se ha separado del disco y está libre en el canal espinal. La quimionucleólisis es normalmente eficaz en discos sobresalientes y extruidos, pero no en lesiones de disco secuestrado.

D. Células que expresan rHuPH20 soluble

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para generar y purificar grandes cantidades de rHuPH20 soluble. La rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que se hacen crecer en cultivo celular a gran escala. La expresión se efectúa usando un vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:3 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 482 del polipéptido de PH20 humana precursor expuesto en SEQ ID NO:1). Tras la traducción, se escinde la secuencia señal de 35 aminoácidos y se secreta la rHuPH20 soluble al medio. El vector también contiene un IRES en el sentido de 3' de la región que codifica para rHuPH20 soluble, un gen de dihidrofolato reductasa de ratón y la secuencia de pA SV40. El vector de expresión se introdujo en células DG44, que son deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-), que se han adaptado para crecer en cultivo en suspensión en un medio libre de productos animales químicamente definido. Las células resultantes que expresan rHuPH20 soluble incluyen aquellas descritas en los ejemplos 1 y 4 a continuación, e incluyen células denominadas células 3D35M, 2B2, 3E10B, 1B3, 5C1, 1G11 y 2G10.

Pueden usarse otras células para producir hialuronidasas similares a rHuPH20. Generalmente, se usan sistemas de expresión de proteínas adecuados para la introducción de residuos de glicosilación ligada a N críticos en hialuronidasas. Tales células incluyen, por ejemplo, células de levadura, células fúngicas, células vegetales, células de insecto y células de mamífero. Muchas líneas celulares están disponibles 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 limitan a, células CHO (incluyendo células DG44 y células CHO-S), Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretoras) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, células Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 y HKB. Las líneas celulares adaptadas a medios libres de suero también están disponibles, lo que facilita la purificación de proteínas secretadas a partir de los medios de cultivo celular.

a. Células 3D35M

Ejemplos de células que expresan rHuPH20 soluble son células 3D35M, descritas en el ejemplo 1 a continuación y en las publicaciones de patente estadounidense n.ºs 20040268425, 20050260186 y 20060104968. Las células 3D35M son células CHO DG44 deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan rHuPH20 soluble. Las células se transformaron con un vector de expresión HZ24 que tenía la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:50. Este vector contiene un promotor de CMV que dirige la expresión de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de 482 aminoácidos (SEQ ID NO:3) que corresponde a las posiciones de aminoácido 1 a 482 de PH20 humana de longitud completa expuesta en SEQ ID NO:1. Este incluye una secuencia señal N-terminal de 35 aminoácidos. El vector también contiene un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) después de la secuencia que codifica para PH20, seguido de un gen de dihidrofolato reductasa de ratón y la secuencia de poliadenilación SV40. Tras la traducción, se procesa el polipéptido de 482 aminoácidos para eliminar la secuencia señal de 35 aminoácidos, dando

como resultado la secreción de rHuPH20 soluble.

La caracterización de células 3D35M demostró que la región de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble está presente en las células en un número de copias de aproximadamente 318 copias/célula. La rHuPH20 soluble producida a partir de células 3D35M mediante los métodos en el presente documento es una mezcla de especies que pueden incluir uno o más de los polipéptidos que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO:4-8. En una caracterización a modo de ejemplo de estas especies (descrita en el ejemplo 11), la especie expuesta en SEQ ID NO:4 estaba presente en una abundancia del 0,2%, la especie expuesta en SEQ ID NO:5 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 446 de SEQ ID NO:4) estaba presente en una abundancia del 18,4%, la especie expuesta en SEQ ID NO:6 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 445 de SEQ ID NO:4) estaba presente en una abundancia del 11,8%, la especie expuesta en SEQ ID NO:7 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 444 de SEQ ID NO:4) estaba presente en una abundancia del 56,1%, y la especie expuesta en SEQ ID NO:8 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 443 de SEQ ID NO:4) estaba presente en una abundancia del 13,6%. Tal heterogeneidad en la preparación de rHuPH20 soluble es probablemente el resultado de la escisión C-terminal mediante las peptidasas presentes durante los métodos de producción y purificación proporcionados en el presente documento.

Las células 3D35M pueden hacerse crecer en medio de cultivo celular con o sin metotrexato. También pueden añadirse complementos adicionales, tales como glutamina. En algunos ejemplos, las células se hacen crecer en medio de cultivo celular que contiene, por ejemplo, metotrexato 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M o 2 μ M y que carece de hipoxantina y timidina. En un ejemplo, las células 3D35M se cultivan a 37°C en el 5-7% de CO₂ en medio de cultivo (tal como medio CD CHO, Invitrogen) sin hipoxantina ni timidina y con 100 nM de metotrexato y glutamina o un sustituto de glutamina, tal como L-alanil-L-glutamina, una forma dipeptídica estabilizada de la L-glutamina. Pueden usarse otros medios de cultivo celular apropiados para células CHO para cultivar células 3D35M, incluyendo, pero sin limitarse a, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), medio de Eagle modificado por Iscove (IMEM), F12 y RPMI. Las células 3D35M que se hicieron crecer en tales condiciones en matraces de centrifugación pueden producir una actividad enzimática en exceso de 1000 unidades/ml. Cuando se cultivan en un biorreactor, tal como se describe en el ejemplo comparativo 3 a continuación, las células 3D35M pueden producir rHuPH20 soluble con una actividad enzimática en exceso de 2000 unidades/ml.

b. Células 2B2

Los ejemplos de células que expresan rHuPH20 soluble para la producción de rHuPH20 en los métodos proporcionados en el presente documento se describen en el ejemplo 4 y se denominan células 2B2. Las células 2B2 se generaron adaptando células 3D35M a mayores niveles de metotrexato (es decir, 20 μ M) y seleccionando clones que crecieron en la mayor concentración de metotrexato. Esta adaptación aumentó la actividad hialuronidasa producida por las células. Las células DG44 son deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-) y, por tanto, no pueden producir nucleósidos. El vector de expresión presente en células 3D35M y 2B2 contiene, además del gen PH20, la secuencia codificante para la dihidrofolato reductasa de ratón. El metotrexato es un potente inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa. Por tanto, al aumentar la concentración de metotrexato en los medios de cultivo, las células que expresan hialuronidasa se ven forzadas a producir más dihidrofolato reductasa de ratón para permanecer viables. Esto puede efectuarse, por ejemplo, mediante amplificación de genes o reorganización del ADN integrado para dar una disposición más estable y productiva. Por tanto, forzar un aumento de la producción de dihidrofolato reductasa de ratón también puede dar como resultado un aumento de la producción de sHuPH20. Una comparación de la actividad enzimática de rHuPH20 soluble producida por células 2B2 y células 3D35M demostró que la actividad estaba normalmente entre el 80% y el 100% mayor en células 2B2 (véase, por ejemplo, el ejemplo 5 a continuación) en comparación con células 3D35M.

Las células 2B2 se seleccionaron de entre los clones celulares que se aislaron tras la selección con metotrexato 20 μ M como la línea celular que produjo rHuPH20 soluble que tenía la actividad enzimática más alta (véase, por ejemplo, el ejemplo 4). Cuando se caracterizó, se observó que la región de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble estaba presente en células 2B2 en un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis por transferencia de tipo Southern de ADN genómico de células 2B2 digerido con Spe I-, Xba I- y BamH I/Hind III usando una sonda específica para la región de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble reveló el siguiente perfil de digestión de restricción: una banda de hibridación principal de ~7,7 kb y cuatro bandas de hibridación secundarias (~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 secundarias (~13,9 y ~6,5 kb) con ADN digerido con Xba I; y una única banda de hibridación de ~1,4 kb observada usando ADN de 2B2 digerido con BamH I/Hind III.

Las células 2B2 pueden hacerse crecer en medio de cultivo celular con o sin metotrexato. También pueden añadirse complementos adicionales, tales como glutamina, insulina y extracto de levadura. En algunos ejemplos, las células se hacen crecer en medio de cultivo celular que contiene, por ejemplo, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M o más de metotrexato y que carece de hipoxantina y timidina. En un ejemplo, las células 2B2 se cultivan a 37°C en el 5-7% de CO₂ en medio de cultivo (tal como medio CD CHO, Invitrogen) sin hipoxantina ni timidina y con metotrexato 20 μ M y glutamina o L-alanil-L-glutamina, una forma dipeptídica estabilizada de la L-glutamina. Pueden usarse otros medios de cultivo celular apropiados para células CHO para cultivar células 2B2, incluyendo, pero sin

limitarse a, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), medio de Eagle modificado por Iscove (IMEM), F12 y RPMI. Las células 2B2 que se hicieron crecer en tales condiciones en matraces de centrifugación pueden producir una actividad hialuronidasa en exceso de 3000 unidades/ml. Cuando se cultivan en un biorreactor, tal como se describe en el ejemplo 8 a continuación, las células 2B2 pueden producir rHuPH20 soluble que tiene una actividad enzimática en exceso de 17000 unidades/ml de actividad hialuronidasa.

La rHuPH20 soluble producida a partir de células 2B2 mediante los métodos en el presente documento es una mezcla de especies de polipéptidos que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO:4-8. En una caracterización a modo de ejemplo del producto de rHuPH20 soluble producido mediante células 2B2 (descrita en el ejemplo 11), la especie expuesta en SEQ ID NO:4 estaba presente en una abundancia del 1,9%, la especie expuesta en SEQ ID NO:5 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 446 de SEQ ID NO:4) estaba presente en una abundancia del 46,7%, la especie expuesta en SEQ ID NO:6 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 445 de SEQ ID NO:4) estaba presente en una abundancia del 16,7%, la especie expuesta en SEQ ID NO:7 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 444 de SEQ ID NO:4) estaba presente en una abundancia del 27,8%; y la especie expuesta en SEQ ID NO:8 (correspondiente a los aminoácidos 1 a 443 de SEQ ID NO:4) estaba presente en una abundancia del 6,9%. Tal como se indicó para la rHuPH20 soluble producida a partir de células 3D35M, la heterogeneidad en la preparación de rHuPH20 soluble a partir de células 2B2 es probablemente el resultado de la escisión C-terminal mediante las peptidasas presentes durante los métodos de producción y purificación proporcionados en el presente documento.

E. Expansión del cultivo celular

Los métodos descritos en el presente documento emplean biorreactores para hacer crecer grandes volúmenes de cultivo celular para producir grandes cantidades de rHuPH20 soluble. Tal como se describe con detalle a continuación, estos métodos incluyen una fase de expansión celular, una fase de producción de proteína, una fase de concentración de proteína e intercambio del tampón y una fase de purificación. Las células que expresan rHuPH20 soluble, tales como las células 2B2, se expanden inicialmente desde un inóculo original, tal como una alícuota de células de un banco de células de trabajo (BCT) o banco de células maestro (BCM), hasta un volumen más grande antes del cultivo en el biorreactor para la fase de producción. El volumen de cultivo final en la fase de expansión es directamente proporcional al volumen del biorreactor usado en la siguiente fase de producción. Normalmente, un biorreactor más grande se inocula usando un volumen de cultivo final más grande de la fase de expansión que un biorreactor más pequeño.

Las células que expresan rHuPH20 soluble se expanden a través de una serie de cultivos, aumentando cada uno en cuanto a volumen con respecto al anterior y usándose cada uno como inóculo para el siguiente cultivo. Ejemplos de tales células son células 2B2. Normalmente, el inóculo original es uno en el que la pureza e identidad de las células y el número de células están definidos. Estas células pueden almacenarse congeladas, tal como a -20°C, -70°C o -80°C, o pueden mantenerse en medios líquidos a, por ejemplo, 4°C, o mantenerse en cultivo a, por ejemplo, 37°C. En algunos casos, el inóculo original es una alícuota de un banco de células maestro o banco de células de trabajo que se ha almacenado congelada. En tales casos, el inóculo se descongela, tal como en un baño de agua a 37°C. Normalmente, el inóculo celular original se centrifuga y las células se resuspenden en un medio de cultivo celular apropiado. Por ejemplo, las células 2B2 pueden resuspenderse en, y posteriormente cultivarse en, medios basales, tales como medios CD CHO (Invitrogen), o medios CD CGO AGT™ en polvo reconstituídos (Invitrogen), complementados con glutamina o L-alanil-L-glutamina 8 mM y metotrexato 20 µM. En otro ejemplo, las células pueden hacerse crecer en medios basales complementados con glutamina o L-alanil-L-glutamina 8 mM y metotrexato 100 mM. También puede usarse cualquier otro medio de cultivo celular adecuado para expandir células que expresan hialuronidasa. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), medio de Eagle modificado por Iscove (IMEM), F12, RPMI u otros medios químicamente definidos o indefinidos, con o sin complementos adicionales. Normalmente, las células se hacen crecer en medios libres de suero, pero también pueden hacerse crecer en medios que contienen suero. Un experto en la técnica podría preparar medios de cultivo celular usando otros medios de cultivo celular basales que pueden complementarse con diversos nutrientes para producir medios de cultivo celular en los que se cultivan las células que expresan rHuPH20 soluble.

El inóculo celular se añade al primero de una serie volúmenes crecientes de medios de cultivo celular, expandiendo de ese modo el cultivo celular. Tras la inoculación inicial, las células se expanden en un biorreactor o una incubadora humidificada a una temperatura apropiada con una cantidad de CO₂ apropiada. Normalmente, la cantidad de CO₂ está entre el 4% y el 9%, normalmente entre el 6,0% y el 8,0%, tal como el 7,0% y la temperatura es de entre 35°C y 39°C, normalmente de entre 36°C y 38°C, tal como de 37°C. Por ejemplo, pueden hacerse crecer células 2B2 y 3D35M en una incubadora humidificada a 37°C con el 7% de CO₂. El cultivo puede agitarse, tal como a 90-130 rpm, durante este procedimiento. Cuando las células alcanzan la densidad deseada, tal como, por ejemplo, mayor de $1,0 \times 10^6$ células/ml (por ejemplo, entre $1,5 \times 10^6$ células/ml y $2,5 \times 10^6$ células/ml), el cultivo celular se usa para inocular un volumen más grande de medios de cultivo celular nuevos. Por ejemplo, las células pueden inocularse en el siguiente cultivo a una densidad de 4×10^4 a 4×10^6 células/ml, normalmente de 2×10^5 a 6×10^5 células/ml, tal como de 4×10^5 células/ml. El procedimiento se repite hasta que las células se han expandido hasta el volumen y la densidad celular deseados para la siembra, por ejemplo, de 4×10^4 a 4×10^6 células/ml en el biorreactor.

En un ejemplo, las células que expresan rHuPH20 soluble, tales como células 2B2, se añaden inicialmente a

aproximadamente 20 ml de medios de cultivo celular nuevos en un matraz de agitación de 125 ml, dando como resultado un volumen de cultivo de 20-30 ml, normalmente de 25 ml. Tras la incubación a 37°C, el 7% de CO₂ y expansión de las células hasta una densidad mayor de $1,5 \times 10^6$ células/ml, se añaden medios nuevos al matraz para expandir el cultivo celular hasta 40 ml. Las células se incuban de nuevo hasta lograr una densidad mayor de $1,5 \times 10^6$ células/ml, después de lo cual se añade todo el cultivo celular (aproximadamente 40 ml) a medios nuevos para producir un volumen de cultivo de 100 ml en un matraz de centrifugación de 125 ml. Este procedimiento se repite transfiriendo todo el cultivo celular (aproximadamente 100 ml) a un matraz de centrifugación de 250 ml que contiene suficiente medio nuevo como para producir un volumen de cultivo final de 200 ml, después a un matraz de centrifugación de 1 l que contiene suficiente medio nuevo como para producir un volumen de cultivo final de 800 ml, después a un matraz de centrifugación de 6 l que contiene suficiente medio nuevo como para producir un volumen de cultivo final de 5 l y finalmente a un matraz de centrifugación de 36 l que contiene suficiente medio nuevo como para producir un volumen de cultivo final de 32 l. Entre cada transferencia, las células se incuban hasta que el cultivo alcanza una densidad mayor de $1,5 \times 10^6$ células/ml. En algunos ejemplos, se logra una mayor densidad celular tras la incubación del matraz de centrifugación de 36 l final. Por ejemplo, las células en el matraz de centrifugación de 36 l pueden expandirse hasta una densidad celular de $3,55 \times 10^6$ células/ml a $6,05 \times 10^6$ células/ml. Este procedimiento puede usarse para expandir células que expresan rHuPH20 soluble antes de la introducción en un biorreactor de 400 l (300 l de volumen de cultivo) para la fase de producción de proteína (véase, por ejemplo, el ejemplo 8).

Un experto en la técnica también puede aumentar de escala este procedimiento, al igual que cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, para la introducción de las células en un biorreactor con un volumen de cultivo mayor de 300 l. Por ejemplo, el procedimiento puede aumentarse de escala para la introducción de las células en un biorreactor con un volumen de cultivo de 2500 l, tal como se describe en el ejemplo 12. Por tanto, en un ejemplo de los métodos proporcionados en el presente documento, tras la descongelación, las células se expanden en serie a través de un matraz de agitación de 125 ml (volumen de trabajo de 20-30 ml, tal como 25 ml), un matraz de agitación de 250 ml (volumen de trabajo de 45-55 ml, tal como 50 ml), un matraz de agitación de 1 l (volumen de trabajo de 190-210 ml, tal como 200 ml), dos matraces de agitación de 2 l (volumen de trabajo de 350-450 ml por matraz, tal como 400 ml por matraz), seis matraces de agitación de 2 l (volumen de trabajo de 350-450 ml por matraz, tal como 400 ml por matraz), un biorreactor de onda de 25 l (volumen de trabajo de 14-16 l, tal como 15 l), un biorreactor de onda de 100 l (volumen de trabajo de 75-85 l, tal como 80 l) y un biorreactor de siembra de 600 l (volumen de trabajo de 440-520 l, tal como 480 l).

F. Producción de proteína

Tras la expansión celular, las células que expresan rHuPH20 soluble se transfieren a un biorreactor para la fase de producción, durante la cual se secretan grandes cantidades de rHuPH20 soluble al medio celular. Esta fase está diseñada normalmente de tal manera que se maximiza el crecimiento celular en la primera mitad de la ejecución en el biorreactor y se maximiza la producción de rHuPH20 soluble en la segunda mitad de la ejecución en el biorreactor. A las células se les proporciona una serie de medios de alimentación en puntos de tiempo particulares durante la producción para regular este procedimiento. Normalmente, las condiciones del biorreactor también se monitorizan para garantizar que se mantienen unas condiciones óptimas durante todo el procedimiento. Los métodos descritos en el presente documento para la proteína pueden aumentarse o disminuirse de escala por un experto en la técnica. Además, modificaciones a, por ejemplo, medios celulares, tiempos de incubación, protocolos de alimentación. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente las condiciones apropiadas para la producción de proteína para cualquier biorreactor y tipo de célula dados.

Pueden utilizarse biorreactores de diferentes tamaños y diseños en los métodos en el presente documento. En algunos ejemplos, se usa un biorreactor de 125 l, 400 l o 3500 l en los métodos en el presente documento para cultivar células en volúmenes de aproximadamente 100 l, 300 l y 2500 l, respectivamente. Normalmente, el biorreactor se esteriliza antes de la adición de medios de cultivo celular o células. La esterilización puede efectuarse mediante esterilización en autoclave o tratando de otro modo con vapor para algunos biorreactores, o mediante tratamiento con una disolución esterilizante, tal como hidróxido de sodio diluido, ácido nítrico diluido o hipoclorito de sodio. En algunos ejemplos, el biorreactor se esteriliza por vapor a 121°C, 20 PSI durante 30 minutos. Tras la esterilización, pueden añadirse los medios de cultivo celular al biorreactor y después evaluar la contaminación, tal como la contaminación microbiana, después de un periodo de tiempo para garantizar que el procedimiento de esterilización fue eficaz.

El cultivo celular de la fase de expansión, descrita anteriormente, se añade al biorreactor esterilizado que contiene medios de cultivo celular nuevos. Las células que expresan rHuPH20 soluble se inoculan en los medios de cultivo celular nuevos a una densidad celular de 10^5 a 10^6 células/ml. En un ejemplo, las células que expresan rHuPH20 soluble se inoculan a una densidad celular de 4×10^5 células/ml. El recuento total de células tras la inoculación depende del tamaño del biorreactor y de la densidad celular. Por ejemplo, un volumen de cultivo celular de 100 l puede tener una densidad celular tras la inoculación de aproximadamente 10^{10} ó 10^{11} células.

Los volúmenes de cultivo celular de inoculación y medios de cultivo nuevos usados dependen del tamaño del biorreactor y de la densidad celular del inóculo. Por ejemplo, pueden añadirse aproximadamente 30 l de células que expresan rHuPH20 soluble, tales como células 2B2, a un biorreactor de 400 l que contiene 230 l de medios de cultivo celular nuevos, para un volumen total de aproximadamente 260 l y una densidad celular de inoculación de 4×10^5

células/ml (recuento total de células de aproximadamente 10^{11} células). Este puede aumentarse o disminuirse de escala según sea necesario, dependiendo del biorreactor. En un ejemplo, para la producción en un biorreactor de 3500 l, se añaden células 2B2 a medios de cultivo celular nuevos para un volumen de cultivo celular total de 1900-2300 l, tal como de 2100 l.

Los medios de cultivo celular nuevos contienen los complementos apropiados para proporcionar los nutrientes necesarios a las células para fomentar el crecimiento celular. Los complementos que pueden añadirse al medio celular basal incluyen, pero no se limitan a, glucosa, insulina, butirato de sodio, extracto de levadura y glutamina o un sustituto de glutamina, tal como L-alanil-L-glutamina. En algunos casos, el medio basal contiene suficiente glucosa, por lo que no es necesario añadir glucosa adicional. En otros casos, se añade glucosa a los medios más adelante en el procedimiento de producción, tal como en un medio de alimentación posterior. La adición de insulina al medio puede fomentar el crecimiento celular y aumentar la densidad celular máxima. La glutamina o los sustitutos de glutamina, tales como L-alanil-L-glutamina, puede respaldar la progresión del ciclo celular y también potenciar el crecimiento celular. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad y calidad de los nutrientes con los que puede complementarse el medio basal. En algunos ejemplos, se añade glutamina o sustituto de glutamina al medio de cultivo celular basal a 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM. Puede añadirse insulina al medio de cultivo celular a, por ejemplo, de 0,5 mg/l a 50 mg/l, tal como de 1 mg/l a 40 mg/l, de 2 mg a 30 mg/l o de 5 mg/l a 20 mg/l. Por ejemplo, puede usarse medio de cultivo celular basal complementado con 5 mg/l de insulina y L-alanil-L-glutamina 8 mM como medio de cultivo celular nuevo en el que se inoculan las células que expresan rHuPH20 soluble. También pueden añadirse complementos adicionales, tales como antibióticos, antifúngicos, indicadores, sales, vitaminas, aminoácidos y factores de crecimiento.

Los parámetros individuales del biorreactor pueden establecerse para mantener las condiciones óptimas durante todo el procedimiento de producción de proteína. Los parámetros específicos que pueden establecerse depende del biorreactor usado, y pueden incluir, pero no se limitan a, temperatura, pH, oxígeno disuelto, velocidad del impulsor, presión del recipiente, burbujeo de aire y la superposición de aire. En un ejemplo, las condiciones de un biorreactor de 125 l que contiene 100 l de cultivo celular de células 3D35M se establecen en: temperatura: 37°C; oxígeno disuelto: 25% \pm 10%; velocidad del impulsor: 50 RPM; presión del recipiente: 3 psi; burbujeo de aire: 1 l/minuto; superposición de aire: 1 l/minuto, pH: 7,2. En otro ejemplo, las condiciones de un biorreactor de 400 l que contiene un volumen de cultivo celular inicial de 260 l se establecen en: temperatura: 37°C; velocidad del impulsor 40-55 RPM; presión del recipiente: 3 psi; burbujeo de aire: 0,5-1,5 l/minuto; superposición de aire: 1 l/minuto. En un ejemplo adicional, las condiciones de un biorreactor de 3000 l que contiene un volumen de cultivo inicial de 2100 l se establecen en: temperatura: 37°C (o entre 36,5°C y 37,5°C); velocidad del impulsor: 35 RPM (o 70-80 RPM); presión del recipiente: 5 psi (o 3-7 psi); burbujeo de aire: 12 l/minuto (u 11-13 l/minuto); oxígeno disuelto: 25% o > 25%; pH antes de la inoculación: 7,2 (o pH 7,1-7,3); pH después de la inoculación: \leq 7,2 (o \leq 7,3). Un experto en la técnica puede determinar empíricamente las condiciones apropiadas para el crecimiento de una célula que expresa rHuPH20 soluble particular en un biorreactor particular.

Las células que expresan rHuPH20 soluble se cultivan normalmente en el biorreactor durante entre 10 y 25 días. En algunos ejemplos, las células que expresan rHuPH20 soluble se cultivan en el biorreactor durante 12, 13, 14, 15 ó 16 días antes de la recogida. En otros ejemplos, las células se recogen cuando el recuento de células viables (VCC) se disminuye a un nivel particular, tal como, por ejemplo, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60% o el 70%. En un ejemplo, las células se recogen cuando el VCC está entre el 30% y el 35%. En otro ejemplo, las células se recogen en el plazo de 24 horas posteriores a la disminución del VCC por debajo del 50%.

Durante el cultivo en el biorreactor, las células se hacen crecer como cultivos semicontinuos y se les proporciona una serie de medios de alimentación en puntos de tiempo particulares para complementar con nutrientes y glucosa de principio a fin. En algunos casos, los nutrientes proporcionados en el medio de cultivo celular en el que se inocularon las células se han agotado en 3, 4, 5, 6, 7 días o más posteriores a la inoculación. Por tanto, proporcionar nutrientes o complementos adicionales puede producir mayores rendimientos de proteína que los cultivos discontinuos. En un ejemplo, a las células se les proporcionan medios de alimentación los días 6, 9 y 11 posteriores a la inoculación. En otro ejemplo, a las células se les proporcionan medios de alimentación los días 7, 9 y 11 posteriores a la inoculación. En un ejemplo adicional, a las células se les proporcionan medios de alimentación los días 5, 7, 9 y 11 posteriores a la inoculación. El volumen de medios de alimentación añadido al cultivo del biorreactor puede oscilar, por ejemplo, entre el 0,5% y el 20%, tal como el 1-20%, el 2-15%, el 3-10% o el 4-5% del volumen de cultivo celular. En algunos casos, los medios de alimentación se añaden a un volumen equivalente al 4% del volumen de cultivo celular.

La adición de diversos complementos a los medios de alimentación se usa para regular el crecimiento y/o ciclo celular de las células. Los nutrientes y complementos que se incluyen en los medios de alimentación incluyen, pero no se limitan a, glutamina o sustituto de glutamina, tal como L-alanil-L-glutamina, insulina, extracto de levadura, glucosa y butirato de sodio o butirato de sodio. Además, los medios basales usados en los medios de alimentación también pueden estar concentrados, proporcionando de ese modo nutrientes adicionales, tales como aminoácidos esenciales, que pueden haberse agotado durante el cultivo celular. Los medios basales en los medios de alimentación pueden estar 2x, 3x, 4x, 5x, 6x o más concentrados. En otros ejemplos, los medios basales están menos concentrados, o tienen la misma concentración que los medios de cultivo celular en el biorreactor.

Los complementos incluidos en los medios de alimentación pueden usarse para regular el crecimiento celular y la producción de proteína. El primer medio de alimentación añadido al cultivo celular puede incluir nutrientes que potencian la progresión del ciclo celular, el crecimiento celular y la densidad celular máxima. Los medios de alimentación posteriores fomentan la detención del crecimiento celular y/o la síntesis de proteína. La cantidad de cada complemento en cada medio de alimentación puede variar, tal como aumentando o disminuyendo de un medio de alimentación al siguiente, o puede ser la misma de un medio de alimentación al siguiente. En algunos ejemplos, la cantidad de un complemento aumenta de un medio de alimentación al siguiente, tal como en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o más. En otros ejemplos, la cantidad de un complemento disminuye de un medio de alimentación al siguiente, tal como en un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más. En un ejemplo, se omite un complemento de un medio de alimentación. En otros ejemplos, la cantidad de un complemento en los medios de alimentación permanece igual. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad óptima de cada complemento para cada medio de alimentación para fomentar la cantidad deseada de crecimiento celular y producción de proteína.

Los complementos o nutrientes que se incluyen en los medios de alimentación incluyen, pero no se limitan a, glucosa, glutamina o sustituto de glutamina, tal como L-alanil-L-glutamina, insulina y butirato de sodio. El tipo y la cantidad de complemento añadido pueden influir en el crecimiento celular y en la producción de proteína. La insulina y el sustituto de glutamina L-alanil-L-glutamina se incorporan en el primer medio de alimentación añadido al cultivo celular para aumentar el crecimiento celular y la densidad celular máxima. Los medios de alimentación posteriores se diseñan para fomentar más la producción de proteína que el crecimiento celular. El complemento insulina se excluye y L-alanil-L-glutamina se reduce en cantidad. En cambio, el complemento extracto de levadura que potencia la síntesis de proteína se aumenta en cantidad. También se incluye butirato de sodio que potencia la detención del ciclo celular y, por tanto, aumenta la producción de proteína.

La adición de insulina puede aumentar la densidad celular máxima en, por ejemplo, un 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o más. La insulina se añade a medios de alimentación tempranos, es decir, el primer medio de alimentación, para fomentar el crecimiento celular máximo en la fase inicial de la ejecución en el biorreactor. Por ejemplo, el primer medio de alimentación puede contener una cantidad de insulina de o de aproximadamente 5 mg/l, 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l, 25 mg/l, 30 mg/l, 35 mg/l, 40 mg/l, 45 mg/l, 50 mg/l, 55 mg/l, 60 mg/l o más.

El sustituto de glutamina L-alanil-L-glutamina también se añade a los medios de alimentación. La cantidad de sustituto de glutamina añadida al primer medio de alimentación es mayor que la cantidad de sustituto de glutamina añadida a los medios de alimentación posteriores. La cantidad de sustituto de glutamina añadida a cada medio de alimentación posterior se reduce en comparación con la cantidad añadida en los medios de alimentación anteriores. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad óptima añadida a cada medio de alimentación, y puede incluir, por ejemplo, concentraciones de sustituto de glutamina de o de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM o más.

Normalmente, los medios basales usados en los medios de alimentación también se complementan con glucosa. La cantidad de glucosa añadida a cada medio de alimentación puede aumentarse o reducirse con respecto a los medios de alimentación anteriores, o puede permanecer aproximadamente constante. En algunos ejemplos, la cantidad de glucosa añadida a los medios de alimentación es de o de aproximadamente 10 g/l, 15 g/l, 20 g/l, 25 g/l, 30 g/l, 35 g/l, 40 g/l, 45 g/l, 50 g/l, 55 g/l, 60 g/l, 75 g/l, 80 g/l o más.

Además, también se incluyen complementos que fomentan la síntesis de proteína. Tales nutrientes incluyen extracto de levadura. En algunos casos, la cantidad de extracto de levadura incluida en los medios de alimentación se aumenta durante la ejecución en el biorreactor. Por ejemplo, la cantidad de extracto de levadura en el tercer medio de alimentación puede aumentarse en comparación con la cantidad en el segundo medio de alimentación, que puede aumentarse en comparación con la cantidad en el segundo medio de alimentación. En algunos ejemplos, la cantidad de extracto de levadura añadida a los medios de alimentación está entre 5 y 1000 g/l, tal como de, o de aproximadamente, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 75 g/l, 100 g/l, 125 g/l, 150 g/l, 175 g/l, 200 g/l, 250 g/l, 300 g/l, 350 g/l, 400 g/l o más.

También se incluyen complementos que potencian la detención del ciclo celular y, por tanto, aumentan la producción de proteína, es decir, butirato de sodio. Normalmente, tal complemento se incluye en medios de alimentación que se añaden al biorreactor más adelante en la ejecución y que no se incluyen en el primer medio de alimentación. Se añade butirato de sodio que potencia la detención del ciclo celular al segundo medio de alimentación y medios de alimentación posteriores. En algunos ejemplos, la cantidad de butirato de sodio añadida a los medios de alimentación está entre 0,1 g/l y 10 g/l, tal como de, o de aproximadamente, 0,2 g/l, 0,3 g/l, 0,4 g/l, 0,5 g/l, 0,6 g/l, 0,7 g/l, 0,8 g/l, 0,9 g/l, 1,0 g/l, 1,1 g/l, 1,2 g/l, 1,3 g/l, 1,4 g/l, 1,5 g/l, 1,6 g/l, 1,7 g/l, 1,8 g/l, 1,9 g/l, 2,0 g/l, 2,5 g/l, 3,0 g/l, 3,5 g/l o más.

Además, pueden alterarse una cualquiera o más de las condiciones del biorreactor durante la fase de producción para optimizar la producción de proteína. Se disminuye la temperatura. Esto puede servir para fomentar la detención del ciclo celular, prolongar la viabilidad celular (aumentando de ese modo la producción de proteína total) y ayudar a estabilizar la hialuronidasa que se ha secretado. Por ejemplo, la temperatura del biorreactor puede reducirse en cada alimentación, tal como desde 37°C hasta 36,5°C en la segunda alimentación, hasta 36°C en la tercera alimentación y

hasta 35,5°C en la cuarta alimentación. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente los medios de alimentación apropiados y el momento en el que proporcionar la alimentación, así como las condiciones apropiadas en el biorreactor.

En un ejemplo, a las células se les proporcionan medios de alimentación los días 6, 9 y 11 posteriores a la inoculación. En otro ejemplo, a las células se les proporcionan medios de alimentación los días 7, 9 y 11 posteriores a la inoculación. En un ejemplo adicional, a las células se les proporcionan medios de alimentación los días 5, 7, 9 y 11 posteriores a la inoculación. Los medios de alimentación proporcionados en cada punto de tiempo son diferentes, y pueden incluir complementos tales como, pero sin limitarse a, glucosa, butirato de sodio, insulina, glutamina o un sustituto de glutamina y extracto de levadura tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, a las células 2B2 que se hacen crecer en un cultivo de 260 l en un biorreactor de 400 l se les puede proporcionar una primera alimentación el día 5 que contiene 10,4 l de 4× medios basales (por ejemplo, medios CD CHO) con 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 32 mM, 16,6 g/l de extracto de levadura y 33 mg/l de insulina, una segunda alimentación el día 7 que contiene 10,8 l de 2× medios basales (por ejemplo, medios CD CHO), 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 16 mM, 33,4 g/l de extracto de levadura y 0,92 g/l de butirato de sodio, una tercera alimentación el día 9 que contiene 10,8 l de 1× medios basales (por ejemplo, medios CD CHO), 50 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 10 mM, 50 g/l de extracto de levadura y 1,80 g/l de butirato de sodio y una cuarta alimentación el día 11 que contiene 1× medios basales (por ejemplo, medios CD CHO), 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 6,6 mM, 50 g/l de extracto de levadura y 0,92 g/l de butirato de sodio. Un experto en la técnica puede aumentar o disminuir la escala para la producción de rHuPH20 en biorreactores más grandes o más pequeños, respectivamente. Además, un experto en la técnica puede alterar la cantidad y el tipo de uno más complementos añadidos a los medios para potenciar el crecimiento celular y/o la producción de proteína.

En otro ejemplo, a las células se les proporcionan los siguientes medios de alimentación los días 5, 7, 9 y 11: medio #1 de alimentación: medios basales + 33 g/l de glucosa + L-alanil-L-glutamina 26,6 mM + 83,3 g/l de Yeastolate + 33 mg/l de rHuInsulina; alimentación #2: medios basales + 33 g/l de glucosa + L-alanil-L-glutamina 13,4 mM + 166,7 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio; alimentación #3: medios basales + 50 g/l de glucosa + L-alanil-L-glutamina 10 mM + 250 g/l de Yeastolate + 1,8 g/l de butirato de sodio; alimentación #4: medios basales + 33,3 g/l de glucosa + L-alanil-L-glutamina 6,7 mM + 250 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio.

G. Recogida del cultivo celular, concentración de proteína e intercambio del tampón

Tras la fase de producción de proteína, las células se recogen y la rHuPH20 soluble que se ha secretado en los medios de cultivo celular se concentra antes del inicio del procedimiento de purificación. Además de concentrar la proteína, los medios de cultivo celular pueden intercambiarse con un tampón apropiado en ese momento. En la técnica se conocen múltiples sistemas y procedimientos para efectuar la concentración de proteína y el intercambio del tampón, y pueden usarse en los métodos en el presente documento. A continuación se describen métodos a modo de ejemplo, y un experto en la técnica reconocerá que estos métodos pueden modificarse con o sustituirse por otros métodos eficaces para conseguir un nivel satisfactorio de concentración de proteína e intercambio del tampón.

Las células se recogen del biorreactor y se procesan a través de un sistema de retirada y clarificación celular para separar el líquido de cultivo celular que contiene la hialuronidasa a partir de las células y del residuo celular. Un ejemplo de un sistema de este tipo es uno que contiene una serie de filtros que permiten que pase a su través y se recoja únicamente la proteína. Puede usarse cualquier filtro o serie de filtros capaz de separar la hialuronidasa a partir de las células y del residuo celular. Por ejemplo, el cultivo celular recogido puede hacerse pasar a través de una serie de filtros de cápsula, tales como filtros de poliéter sulfona. Estos pueden tener tamaños de poro decrecientes para eliminar gradualmente, por ejemplo, las células, el residuo celular y las partículas más pequeñas, tales como los virus. En algunos ejemplos, se usa una serie de cuatro filtros con tamaños de poro de 8,0 µm, 0,65 µm, 0,22 µm y 0,22 µm para clarificar el cultivo celular para obtener el líquido de cultivo celular recogido (HCCF). Otro ejemplo de un sistema de eliminación y clarificación de células que puede usarse en los métodos en el presente documento es una serie de filtros que, en la primera etapa, contiene cuatro módulos en paralelo, conteniendo cada uno una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana de celulosa. La segunda etapa contiene un único módulo que contiene una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,1-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm, seguido de una membrana de celulosa, y la tercera etapa es un filtro de cápsula de poliéter sulfona de 0,22 µm.

Una vez separadas las células y el sedimento celular a partir del HCCF, normalmente se concentra la proteína en el HCCF y se intercambian los medios de cultivo celular con un tampón apropiado. La proteína puede concentrarse 2×, 3×, 4×, 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 11×, 12×, 13× o más. En algunos ejemplos, la proteína se concentra 10×. En otros ejemplos, la proteína se concentra 6×. Puede utilizarse cualquier método de concentración de proteína conocido en la técnica. Los ejemplos de tales métodos incluyen concentración usando sistemas de filtración de flujo tangencial (TFF) con filtros de corte de peso molecular (MWCO). Por ejemplo, el HCCF clarificado puede hacerse pasar a través de una serie de dos filtros de poliéter sulfona en espiral de 30 kDa de MWCO para concentrar la proteína 10×. En otro ejemplo, el HCCF se hace pasar a través de una serie de cuatro filtros de 30 kDa de MWCO. Para la producción a gran escala de hialuronidasa, tal como, por ejemplo, cultivos de 100 l y 300 l, normalmente se emplean filtros con áreas de superficie de entre 0,5 y 5 m² para este fin. En algunos ejemplos, se usan filtros con un área de superficie de

1,2 m² o 2,8 m².

Se realiza un intercambio del tampón tras la concentración de proteína. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente un tampón apropiado. Un ejemplo de tampones adecuados es tampón Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0 o tampón Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. Normalmente, tras la recogida, la concentración y el intercambio del tampón, la disolución de proteína concentrada se hace pasar a través de otro filtro, tal como un filtro de cápsula de 0,22 µm, antes de almacenarse en una bolsa de almacenamiento estéril.

En algunos ejemplos, la disolución de proteína concentrada se trata para inactivar cualquier contaminación viral residual. La inactivación de virus puede efectuarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la disolución de proteína concentrada puede mezclarse con Triton X-100 al 10%, fosfato de tri(n-butilo) (TNBP) al 3%, hasta una concentración final de Triton X-100 al 1%, TNBP al 0,3%, a temperatura ambiente durante entre 15 y 75 minutos. En algunos ejemplos, la proteína se expone a la disolución de inactivación de virus durante 30-45 minutos.

H. Purificación

La rHuPH20 soluble se purifica a partir de la disolución de proteína concentrada usando una serie de etapas de purificación. En la técnica se conocen muchas técnicas de purificación, y pueden utilizarse en los métodos en el presente documento. Tales métodos pueden incluir, pero no se limitan a, métodos cromatográficos, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad (AC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de fase inversa (RPC) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), y métodos de filtración en gel, o cualquier combinación de los mismos.

Un ejemplo de métodos de purificación que se usan para los métodos en el presente documento es una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de afinidad. En la cromatografía de intercambio iónico, las proteínas pueden separarse a partir de una disolución o mezcla compleja basándose en las fuerzas electrostáticas entre los grupos funcionales cargados de las proteínas y los grupos funcionales cargados de la matriz de la columna de cromatografía. Las resinas de intercambio catiónico tienen grupos funcionales cargados negativamente que atraen a los grupos funcionales cargados positivamente de las proteínas y las resinas de intercambio aniónico tienen grupos funcionales cargados positivamente que atraen a los grupos funcionales cargados negativamente de las proteínas. Las proteínas unidas a través de fuerzas electrostáticas a la matriz pueden eluirse aumentando la fuerza iónica de la disolución de tampón dentro de la columna de cromatografía a lo largo del tiempo. En la cromatografía de interacción hidrófoba, una proteína puede separarse a partir de una disolución o mezcla compleja basándose en su hidrofobicidad. Se aplica una disolución compleja que contiene la proteína a una columna de cromatografía equilibrada con un tampón con alto contenido en sales que facilita la unión de la proteína a la resina. Después se introduce una fase móvil de gradiente de sales con fuerza iónica descendente en la columna de cromatografía para liberar las proteínas unidas de la matriz. Alternativamente, la cromatografía de interacción hidrófoba puede separar una proteína monomérica a partir de una disolución o mezcla compleja uniendo impurezas hidrófobas, incluyendo agregados y dímeros inactivos de la proteína, al tiempo que se permite que la proteína monomérica fluya a través de la columna de cromatografía relativamente sin obstáculos. En la cromatografía de afinidad, una proteína puede separarse a partir de una disolución compleja basándose en la afinidad de la proteína por un ligando o una entidad de unión a ligando que se une covalentemente a la matriz. Otras proteínas en la disolución o mezcla compleja con afinidad débil, o que carecen de afinidad, por el ligando o la entidad de unión a ligando fluyen a través de la columna de cromatografía sin obstáculos, dejando a la proteína de interés unida a la matriz. Después puede eluirse la proteína de la columna de cromatografía alterando las condiciones del tampón para disminuir la afinidad por el ligando o la entidad de unión a ligando.

En un ejemplo, la rHuPH20 soluble se purifica a partir de la disolución de proteína concentrada mediante purificación secuencial a través de una columna de agarosa reticulada con perlas, tal como una columna Q Sepharose™ (cromatografía de intercambio iónico), una columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas, tal como una columna Phenyl Sepharose™ (cromatografía de interacción hidrófoba), una columna de boronato de aminofenilo (cromatografía de afinidad) y finalmente a través de una columna de hidroxipatita (cromatografía de intercambio iónico). Cada una de estas columnas presenta diferentes propiedades de unión con respecto a la hialuronidasa, de tal manera que la columna de agarosa reticulada con perlas (por ejemplo, columna Q Sepharose™) es una etapa de captura (es decir, la rHuPH20 soluble se une a la resina mientras que otras proteínas fluyen a su través), la columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas (por ejemplo, columna Phenyl Sepharose™) es una etapa de fracción no retenida (es decir, la rHuPH20 soluble fluye a través de la columna mientras que otras proteínas son capturadas), la columna de boronato de aminofenilo es otra etapa de captura y la columna de hidroxipatita es una etapa de pulido para purificar adicionalmente la rHuPH20 soluble.

Normalmente, antes de su uso, se esterilizan y equilibran las columnas. La esterilización puede efectuarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, esterilización con NaOH 1,0 M. El equilibrado puede efectuarse mediante la adición de un tampón apropiado a la columna, tal como un tampón similar a o el mismo que el tampón usado para lavar posteriormente la columna o el tampón en el que está contenida la proteína antes de la carga. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente tampones adecuados para su uso en el equilibrado de cada columna. A continuación se proporcionan tampones a modo de ejemplo. Entre cada etapa de cromatografía, la

proteína eluida puede filtrarse, tal como a través de un filtro de 0,22 μm , para retirar cualquier microorganismo contaminante o agregados grandes. En algunos ejemplos, el eluato filtrado se almacena, tal como en bolsas de almacenamiento estériles, antes de su uso en la siguiente etapa. Tras la cromatografía en columna, la hialuronidasa purificada puede someterse posteriormente a una etapa de eliminación de virus, seguido de concentración de proteína e intercambio del tampón para la formulación final. A continuación se describen con más detalle métodos de purificación a modo de ejemplo.

1. Columna de agarosa reticulada con perlas

La proteína concentrada obtenida a partir del líquido de cultivo celular recogido (HCCF) puede cargarse en una columna de agarosa reticulada con perlas, tal como, por ejemplo, una columna Q Sepharose™, que es un intercambiador aniónico fuerte y captura la rHuPH20 soluble mientras deja fluir a su través otras proteínas. Después puede eluirse la rHuPH20 soluble unida usando un tampón apropiado. Las dimensiones de la columna usada dependen normalmente del volumen de proteína concentrada obtenida a partir del HCCF. Por ejemplo, la proteína concentrada obtenida a partir del cultivo de células que expresan hialuronidasa en un cultivo de biorreactor de 100 l puede cargarse en una columna que tiene 20 cm de alto, 14 cm de diámetro y contiene 3 l de resina. En otro ejemplo, la proteína concentrada obtenida a partir del cultivo de células que expresan rHuPH20 soluble en un cultivo de biorreactor de 300 l puede cargarse en una columna que tiene 29 cm de alto, 20 cm de diámetro y contiene 9 l de resina. Esta puede aumentarse o disminuirse de escala según sea necesario, dependiendo del volumen de la disolución de proteína concentrada y de la cantidad esperada de proteína. Por ejemplo, la proteína concentrada obtenida a partir del cultivo de células que expresan rHuPH20 soluble en un cultivo de biorreactor de 20 l puede cargarse en una columna Q Sepharose™ que tiene 28 cm de alto, 7 cm de diámetro y contiene 1,1 l de resina, y la proteína concentrada obtenida a partir del cultivo de células que expresan rHuPH20 soluble en un cultivo de biorreactor de 2500 l puede cargarse en una columna Q Sepharose™ que tiene 26 cm de alto, 63 cm de diámetro y contiene 81 l de resina.

Normalmente, antes de la carga con la proteína, se equilibra la columna. El equilibrado puede efectuarse haciendo pasar a su través 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más volúmenes de columna de tampón. En algunos ejemplos, se hacen pasar 5 volúmenes de columna de tampón a través de la columna para el equilibrado. Los tampones adecuados para el equilibrado incluyen aquellos similares a los tampones que se usarán para lavar la columna después de haberse cargado la proteína. Por ejemplo, una columna de agarosa reticulada con perlas, tal como una columna Q Sepharose™, puede equilibrarse con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,5. Pueden usarse otros tampones de pH neutro, tal como reconocerá un experto en la técnica.

Después de cargar el concentrado de proteína, se lava la columna y se eluye la proteína. Los tampones adecuados para lavar tales columnas que contienen rHuPH20 soluble unida incluyen, por ejemplo, Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0; Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0; y Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. La columna puede lavarse con uno o más tipos de tampón. Por ejemplo, la columna puede lavarse con Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. Normalmente, el lavado se efectúa haciendo pasar a su través 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más volúmenes de columna de tampón. En algunos ejemplos, se usan 5 volúmenes de columna de tampón para lavar la columna. Después se eluye la rHuPH20 soluble usando un tampón con una mayor concentración de sales, tal como, por ejemplo, Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0. En algunos ejemplos, se monitoriza la absorbancia a A₂₈₀ para determinar cuándo recoger el eluato, ya que generalmente cualquier absorbancia durante este procedimiento indica la presencia de rHuPH20 soluble. Por tanto, en un ejemplo, el eluato se recoge cuando la absorbancia que comienza a leerse es de 0,025. Normalmente, el eluato se filtra a través de un filtro apropiado, tal como un filtro de 0,22 μm , antes de almacenarse, tal como en una bolsa de almacenamiento estéril.

2. Columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas

Tras la purificación a través de una columna de agarosa reticulada con perlas, la disolución de proteína puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba usando una columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas, tal como una columna Phenyl Sepharose™, en la que la rHuPH20 soluble fluye a través de la columna mientras que otras proteínas contaminantes son capturadas. La columna usada en los métodos en el presente documento puede oscilar en cuanto a tamaño, dependiendo del volumen y de la cantidad de proteína que va a purificarse a través de la misma. Los tamaños a modo de ejemplo incluyen columnas que tienen 29 cm de alto, 20 cm de diámetro con 9 l de resina para su uso en la purificación de rHuPH20 soluble a partir de células hechas crecer en un cultivo de biorreactor de 100 l, columnas que tienen 29 cm de alto, 30 cm de diámetro con 19-21 l de resina para su uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células hechas crecer en un cultivo de biorreactor de 300 l y columnas que tienen 35 cm de alto, 80 cm de diámetro con 176 l de resina para su uso en la purificación de rHuPH20 soluble a partir de células hechas crecer en un cultivo de biorreactor de 2500 l. Un experto en la técnica puede aumentar o disminuir la escala según sea apropiado.

La columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas, tal como una columna Phenyl Sepharose™, esterilizada puede equilibrarse antes de la carga de la proteína con un tampón apropiado, tal como, por ejemplo, fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. El eluato de proteína a partir de la purificación en columna Q Sepharose también se complementa con sulfato de amonio, fosfato de potasio y CaCl₂. Estos pueden

complementarse a la proteína hasta concentraciones finales de aproximadamente, por ejemplo, fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl_2 0,1 mM, pH 7,0. Tras la carga de la proteína, también se añade fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl_2 0,1 mM, pH 7,0 a la columna y se recoge lo filtrado que fluyó a su través, tal como en una bolsa estéril.

3. Columna de boronato de aminofenilo

Tras la cromatografía de interacción hidrófoba, la proteína purificada en columna puede cargarse en una columna de boronato de aminofenilo para una purificación adicional. La cromatografía mediada por ligandos boronato de aminofenilo difiere de muchos otros ligandos usados para la cromatografía de afinidad. Mientras que la mayoría de los ligandos se unen a un sitio de unión particular en una proteína mediante una mezcla de interacciones no covalentes, el boronato de fenilo interacciona predominantemente formando un enlace covalente temporal con los grupos 1,2-cis-diol. El ligando boronato se unirá a cualquier molécula que contenga el grupo apropiado, incluyendo a la rHuPH20 soluble, que está altamente glicosilada.

La columna de boronato de aminofenilo usada en los métodos en el presente documento puede oscilar en cuanto a tamaño, dependiendo del volumen y de la cantidad de proteína que va a purificarse a través de la misma. Los tamaños a modo de ejemplo incluyen columnas que tienen 29 cm de alto, 20 cm de diámetro con 6,3 l de resina para su uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células hechas crecer en un cultivo de biorreactor de 100 l, columnas que tienen 29 cm de alto, 30 cm de diámetro con 19-21 l de resina para su uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células hechas crecer en un cultivo de biorreactor de 300 l y columnas que tienen 35 cm de alto, 80 cm de diámetro con 176 l de resina para su uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células hechas crecer en un cultivo de biorreactor de 2500 l. Un experto en la técnica puede aumentar o disminuir la escala según sea apropiado. Los tampones adecuados para equilibrar la columna de boronato de aminofenilo incluyen, por ejemplo, tampones que contienen fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0.

Tras la carga de la proteína purificada en columna Phenyl Sepharose en la columna de boronato de aminofenilo, se lava la columna con tampones de lavado adecuados. Los tampones de lavado a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0 y bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0 y bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0. En un ejemplo, la columna de boronato de aminofenilo con la hialuronidasa unida se lava en primer lugar con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, después con bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0 y finalmente con bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0. Después puede eluirse la hialuronidasa unida, tal como con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0. Un experto en la técnica puede modificar uno o más de los tampones para efectuar de manera similar la purificación. Normalmente, la rHuPH20 soluble eluida también se filtra para retirar cualquier contaminación microbiana o agregados grandes.

4. Columna de hidroxiapatita

Tras la cromatografía en columna de boronato de fenilo, la disolución de proteína que contiene la rHuPH20 soluble puede cargarse en una columna de hidroxiapatita en una etapa de pulido final. La hidroxiapatita es una forma cristalina de fosfato de calcio con la fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Puede usarse como etapa de pulido para separar proteínas que se purifican conjuntamente muy cerca, funcionando mediante intercambio iónico en modo mixto debido a la inclusión de restos cargados tanto positiva como negativamente. Hay diversos medios cromatográficos de hidroxiapatita disponibles comercialmente, y puede usarse cualquier forma disponible del material en los métodos en el presente documento. Los ejemplos de hidroxiapatitas incluyen, pero no se limitan a, aquellas que se aglomeran para formar partículas y se sinterizan a altas temperaturas para dar una masa cerámica porosa estable. El tamaño de partícula puede variar, tal como desde aproximadamente 1 μm hasta aproximadamente 1.000 μm de diámetro. La porosidad también puede variar, tal como desde aproximadamente 100 Å hasta aproximadamente 10.000 Å.

La columna de hidroxiapatita usada en los métodos en el presente documento puede oscilar en cuanto a tamaño, dependiendo del volumen y de la cantidad de proteína que va a purificarse a través de la misma. Los tamaños a modo de ejemplo incluyen columnas que tienen 20 cm de alto, 30 cm de diámetro con 13 l de resina para su uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células hechas crecer en un cultivo de biorreactor de 300 l y columnas que tienen 23 cm de alto, 80 cm de diámetro con 116 l de resina para su uso en la purificación de hialuronidasa a partir de células hechas crecer en un cultivo de biorreactor de 2500 l. Un experto en la técnica puede aumentar o disminuir la escala según sea apropiado.

Para los métodos descritos en el presente documento, la columna de hidroxiapatita puede equilibrarse con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 200 mM o fosfato de potasio 5 mM, NaCl 200 mM, CaCl_2 0,1 mM, pH 7,0. El equilibrado usando disoluciones tales como estas, hace que la columna sea compatible con la hialuronidasa parcialmente purificada, que a su vez se complementa con fosfato de potasio y CaCl_2 hasta concentraciones finales de 5 mM y 0,1 mM, respectivamente. Tras la carga de la proteína en la columna, la columna puede lavarse con, por ejemplo, fosfato de potasio 10 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM, pH 7,0, para retirar cualquier proteína contaminante no unida. Después puede eluirse la rHuPH20 soluble unida con un tampón de elución apropiado. Por ejemplo, la elución puede efectuarse mediante la adición de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0. En algunos ejemplos, el eluato se filtra, tal como a través de un filtro de 0,22 μm .

6. Eliminación de virus, concentración de proteína e intercambio del tampón

La rHuPH20 soluble obtenida tras la cromatografía en columna puede someterse a etapas posteriores a la purificación que sirven para formular la proteína en el tampón deseado a la concentración deseada. La proteína también puede someterse a una etapa de eliminación de virus para garantizar que esté libre de contaminación y sea adecuada para su uso como opción terapéutica. La eliminación de virus se efectúa normalmente con el uso de un filtro que permite que pase a su través únicamente la proteína soluble mientras que atrapa cualquier virus (y otros contaminantes que tienen el mismo tamaño o son más grandes que los virus). Tales filtros están disponibles comercialmente, y puede usarse cualquiera en los métodos en el presente documento. Los tamaños de poro de los filtros útiles para la eliminación de virus incluyen, pero no se limitan a, 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 75 nm y 100 nm. En un ejemplo, la hialuronidasa purificada se filtra a través de un filtro que contiene poros de 20 nm. La proteína puede bombearse hacia el filtro, por ejemplo, mediante una bomba peristáltica o mediante el uso de un tanque de presión.

Tras la eliminación de virus, la rHuPH20 soluble puede concentrarse y someterse a intercambio del tampón. La rHuPH20 soluble puede concentrarse 2×, 3×, 4×, 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 11×, 12×, 13× o más. En algunos ejemplos, la proteína se concentra aproximadamente 6×. Esto puede dar como resultado, por ejemplo, una concentración de entre 0,1 mg/ml y 50 mg/ml. En algunos ejemplos, la hialuronidasa purificada se concentra hasta aproximadamente 1 mg/ml. En otros ejemplos, la hialuronidasa purificada se concentra hasta aproximadamente 10 mg/ml. Puede utilizarse cualquier método de concentración de proteína conocido en la técnica. Los ejemplos de tales métodos incluyen concentración usando sistemas de filtración de flujo tangencial (TFF) con filtros de corte de peso molecular (MWCO). Por ejemplo, la hialuronidasa purificada puede hacerse pasar a través de un filtro de poliéter sulfona en espiral de 10 kDa de MWCO para concentrar la proteína 10×. En otro ejemplo, la proteína se hace pasar a través de una serie de cuatro filtros de 30 kDa de MWCO. Para la producción a gran escala de hialuronidasa, tal como, por ejemplo, cultivos de 100 l y 300 l, normalmente se emplean filtros con áreas de superficie de entre 0,5 y 5 m² para este fin. En algunos ejemplos, se usan filtros con un área de superficie de 1,2 m² o 2,8 m².

En general, el intercambio del tampón se realiza tras la concentración de proteína para formular la proteína en el tampón deseado para su uso posterior, por ejemplo, como opción terapéutica. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente un tampón apropiado. Ejemplos de tampones adecuados son tampones salinos, incluyendo, pero sin limitarse a, Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7,0 e histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0. En algún ejemplo, la hialuronidasa purificada puede hacerse pasar a través de otro filtro, tal como un filtro de cápsula de 0,22 µm, antes de almacenarse en un entorno estéril.

I. Llenado

Los métodos descritos en el presente documento para la producción y purificación de rHuPH20 soluble también pueden incluir una etapa de llenado, en la que la proteína purificada se llena de manera aséptica en recipientes más pequeños para almacenamiento a largo plazo y uso. La rHuPH20 soluble puede cargarse en los recipientes como una formulación líquida, o como un polvo, tal como después de la liofilización. Para la producción a gran escala, normalmente se usan sistemas de llenado automatizados que incluyen, por ejemplo, bombas para transferir la proteína a los recipientes y plataformas de pesaje para medir el volumen de llenado, y están ampliamente disponibles. Sin embargo, también puede realizarse el llenado manual o una combinación de llenado automatizado y manual de recipientes. Los recipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, viales de vidrio o plástico, envases alveolados, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, jeringas, frascos o cualquier otro recipiente adecuado. También pueden usarse cierres o tapas adecuados para sellar el recipiente. El procedimiento de llenado puede incluir, en primer lugar, hacer pasar la rHuPH20 soluble a través de un filtro antes del llenado para retirar los contaminantes microbianos y agregados o sedimentos más grandes. Por ejemplo, la proteína puede filtrarse a través de un filtro de 0,22 µm antes de dividirla en alícuotas en recipientes adecuados. Un experto en la técnica puede determinar el volumen de llenado apropiado, y puede incluir, por ejemplo, volúmenes que oscilan desde 0,1 ml hasta 100 ml. En algunos ejemplos, los viales se llenan de manera aséptica con 1 ml, 5 ml o 20 ml de rHuPH20 soluble. Tras el tapado o cierre de los recipientes, los recipientes pueden almacenarse a una temperatura apropiada. En algunos ejemplos, los recipientes se ultracongelan y se almacenan a entre -15°C y -35°C. En otros ejemplos, los recipientes se refrigeran, tal como a entre 3°C y 15°C. Normalmente, el almacenamiento a largo plazo de líquidos es a temperaturas más bajas para minimizar la degradación. La rHuPH20 soluble en forma de polvo puede almacenarse durante largos periodos a temperatura ambiente sin degradación significativa.

J. Monitorización y ensayos

Los métodos descritos en el presente documento pueden monitorizarse en una o más etapas, midiendo una o más condiciones, parámetros o productos en cada punto. Esto puede garantizar que se mantengan las condiciones óptimas en todo momento, y también puede usarse para evaluar la eficiencia y productividad del procedimiento. La monitorización puede tener lugar, por ejemplo, una o más veces durante la fase de expansión celular, la fase de producción de proteína (es decir, en el biorreactor) y/o la fase de purificación de proteína, así como en cualquier momento entre, antes o después, tal como durante los procedimientos de concentración/intercambio del tampón o

llenado. La monitorización puede incluir, pero no se limita a, medir el pH, la temperatura, los volúmenes, la contaminación, la pureza, la concentración de proteína, la actividad enzimática, la viabilidad celular y el número de células. Además de monitorizar las condiciones, los parámetros o los productos durante todo el procedimiento, puede evaluarse la rHuPH20 soluble purificada producida como producto final y caracterizarse con respecto a, por ejemplo, la concentración de proteína, la actividad enzimática, las impurezas, la contaminación, la osmolaridad, la degradación, las modificaciones postraduccionales y el contenido de monosacáridos.

1. Monitorización de las condiciones

Las condiciones durante una o más de las etapas en los métodos proporcionados en el presente documento pueden monitorizarse para garantizar que se mantengan las condiciones óptimas durante todo el procedimiento. Si la monitorización demuestra que las condiciones no se encuentran dentro de un intervalo óptimo, entonces pueden alterarse las condiciones. Las condiciones que pueden monitorizarse varían para cada procedimiento. Por ejemplo, durante las fases de cultivo celular (es decir, expansión celular y producción de proteína en el biorreactor), las condiciones que van a monitorizarse incluyen, pero no se limitan a, temperatura, pH del cultivo celular, nutrientes del cultivo celular (por ejemplo, glucosa), niveles de CO₂ y niveles de O₂. Normalmente, las condiciones se monitorizan automáticamente usando sistemas integrados en, por ejemplo, la incubadora o el biorreactor.

Durante la etapa de purificación de proteína, las condiciones que pueden monitorizarse incluyen, pero no se limitan a, pH, conductividad y velocidad de flujo. Estas condiciones pueden monitorizarse antes, durante y/o después de una o más etapas de cromatografía en columna. Por ejemplo, pueden monitorizarse los tampones usados para equilibrar, lavar o eluir la columna. Esto puede realizarse antes de cargar el tampón o después de hacer pasar el tampón a través de la columna.

2. Monitorización de la producción de rHuPH20 soluble

La producción de rHuPH20 soluble, y los parámetros asociados con la producción de rHuPH20 soluble, también pueden monitorizarse durante todo el procedimiento. Estos incluyen, pero no se limitan a, número de células, viabilidad celular, contaminación, concentración de proteína, actividad enzimática, pureza, osmolaridad, modificaciones postraduccionales. Puede usarse cualquier método para evaluar estos parámetros. Por ejemplo, la viabilidad de células de mamífero puede evaluarse tomando una pequeña alícuota del cultivo celular y tiñendo con azul de tripano, que permea únicamente membranas celulares dañadas, tiñendo de ese modo únicamente células muertas. Las células pueden visualizarse bajo un microscopio y contarse usando, por ejemplo, un hemocitómetro. Otros métodos incluyen evaluar la viabilidad celular midiendo la actividad metabólica. Por ejemplo, puede incubarse una alícuota del cultivo celular con una sal de tetrazolio (por ejemplo, MTT, XTT o WST-1) que se escinde en un producto de formazano coloreado por células metabólicamente activas.

La concentración de rHuPH20 soluble en una muestra particular puede evaluarse mediante métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA); SDS-PAGE; métodos de Bradford, Lowry y/o BCA; absorbancia UV y otros métodos cuantificables de marcaje de proteínas, tales como, pero sin limitarse a, métodos inmunológicos, radiactivos y fluorescentes y métodos relacionados. Además, la presencia y el grado de degradación pueden medirse mediante técnicas convencionales tales como electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), inmunotransferencia de tipo Western de muestras que contienen hialuronidasa sometida a electroforesis y cromatografía, tal como, por ejemplo, RP-HPLC. La pureza de una muestra que contiene hialuronidasa puede evaluarse, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, RP-HPLC, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio aniónico y isoelectroenfoque (IEF). Las muestras que contienen rHuPH20 soluble, tales como muestras que contienen hialuronidasa purificada, pueden caracterizarse adicionalmente evaluando el contenido de ácido siálico y de monosacáridos. Esto puede lograrse, por ejemplo, hidrolizando la muestra con ácido trifluoroacético al 40%, marcando de manera fluorescente los monosacáridos liberados y separándolos usando RP-HPLC (véase el ejemplo 10).

La rHuPH20 soluble producida y purificada usando los métodos proporcionados en el presente documento también puede evaluarse para determinar la presencia de modificaciones postraduccionales. Tales ensayos se conocen en la técnica, e incluyen ensayos para medir la glicosilación, hidroxilación y carboxilación. En un ensayo a modo de ejemplo para la glicosilación, puede realizarse el análisis de hidratos de carbono, por ejemplo, mediante análisis por SDS-PAGE de rHuPH20 soluble expuesta a tratamiento de hidrazinólisis o con endoglicosidasa. La hidrazinólisis libera glicanos unidos a N y O a partir de glicoproteínas mediante incubación con hidrazina anhidra, mientras que la liberación de endoglicosidasa implica a la PNGasa F, que libera la mayoría de los N-glicanos a partir de las glicoproteínas. El tratamiento de hidrazinólisis o con endoglicosidasa de polipéptidos de rHuPH20 soluble genera un extremo reductor que puede etiquetarse con un marcador fluoróforo o cromóforo. Los polipéptidos de rHuPH20 soluble marcados pueden analizarse mediante electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforo (FACE). La etiqueta fluorescente para glicanos también puede usarse para el análisis de monosacáridos, el perfilado o análisis de la huella de patrones de glicosilación complejos mediante HPLC. Los métodos de HPLC a modo de ejemplo incluyen cromatografía de interacción hidrófila, interacción electrónica, intercambio iónico, interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión molecular. Las sondas de glicanos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, 3-(acetilamino)-6-aminoacridina (AA-Ac) y ácido 2-aminobenzoico (2-AA). Los restos de hidrato de carbono también pueden detectarse

mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen el polipéptido de hialuronidasa glicosilada.

Un ensayo a modo de ejemplo para medir la β -hidroxilación comprende análisis por HPLC de fase inversa de polipéptidos de rHuPH20 soluble que se han sometido a hidrólisis alcalina (Przysiecki *et al.* (1987) PNAS 84:7856-7860). La carboxilación y γ -carboxilación de polipéptidos de hialuronidasa puede evaluarse usando espectrometría de masas con análisis de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF), tal como se describe en la técnica (véase, por ejemplo, Harvey *et al.* J Biol Chem 278:8363-8369, Maum *et al.* Prot Sci 14:1171-1180).

La actividad enzimática de rHuPH20 soluble en una muestra puede evaluarse en cualquier punto durante los métodos descritos en el presente documento. En un ejemplo, la actividad se mide usando un ensayo de microturbidez (véase, por ejemplo, el ejemplo 10). Este se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con albúmina sérica. La actividad se mide incubando rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo establecido (por ejemplo, 10 minutos) y después precipitando el hialuronato de sodio sin digerir con la adición de albúmina sérica acidificada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un periodo de desarrollo adicional. La disminución de la turbidez resultante de la actividad enzimática sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática de rHuPH20 soluble. En otro ejemplo, la actividad enzimática se mide usando un ensayo de microtitulación en el que se mide ácido hialurónico biotinilado residual tras la incubación con la muestra que contiene rHuPH20 soluble (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 se biotinilan y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado se acopla covalentemente a una placa de microtitulación. Tras la incubación con la muestra que contiene rHuPH20 soluble, el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual se detecta usando una reacción de avidina-peroxidasa y se compara con el obtenido después de la reacción con patrones de hialuronidasa de actividad conocida. En la técnica también se conocen otros ensayos para medir la actividad enzimática 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 monitorizarse la presencia de cualquier contaminación. La contaminación puede incluir, pero no se limita a, contaminación microbiana (por ejemplo, virus, bacterias y micoplasma), contaminación por productos microbianos (por ejemplo, endotoxina) u otras impurezas relacionadas con el procedimiento. Puede usarse cualquier método o ensayo adecuado. Por ejemplo, los virus y las bacterias pueden cultivarse usando métodos bien conocidos en la técnica para determinar si están presentes o no en una muestra, y si es así, en qué cantidades. La microscopía también puede usarse para detectar la contaminación microbiana. Por ejemplo, una muestra puede evaluarse para determinar la presencia de virus o bacterias usando microscopía electrónica de transmisión (TEM). La detección de micoplasma puede efectuarse usando, por ejemplo, técnicas bioquímicas o moleculares, incluyendo, pero sin limitarse a, PCR para amplificar ácido nucleico específico de micoplasma, pruebas bioquímicas para detectar enzimas micoplásmicas y fluorescencia basada en células para detectar antígenos o ácidos nucleicos micoplásmicos.

También puede monitorizarse la presencia de productos microbianos, tales como endotoxinas bacterianas. Un ejemplo de un ensayo adecuado para detectar la presencia de endotoxina es el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). Pueden usarse dos tipos de ensayos de LAL: coagulación en gel y fotométrico (cromógeno y turbométrico). El LAL es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura. La endotoxina desencadena una cascada de reacciones enzimáticas, que dan como resultado una enzima de coagulación activada. En presencia de endotoxinas bacterianas, a una temperatura elevada, el reactivo de LAL se coagulará después de la adición del reactivo. La formación del coágulo de gel es proporcional a la concentración de la endotoxina. En el ensayo cinético, la proenzima en el LAL se activa cuando entra en contacto con endotoxinas producidas por bacterias Gram-negativas. La tasa de activación es directamente proporcional a la concentración de la endotoxina presente. El nivel de activación puede medirse a través de una reacción posterior con el sustrato que se mide espectrofotométricamente.

K. Ejemplos

EJEMPLO 1

Generación de una línea celular que expresa rHuPH20 soluble

Se usó el plásmido HZ24 (expuesto en SEQ ID NO:50) para transfectar células de ovario de hámster chino (CHO) (véase, por ejemplo, las solicitudes relacionadas n.ºs 10.795.095, 11/065.716 y 11/238.171). El vector plasmídico 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:47), 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 también incluye ADN que codifica para el gen resistente a beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación f1, una región potenciadora/promotora inmediata-temprana del citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico y una señal de poliadenilación tardía del SV40 (SV40). El ADN que codifica para el constructo de rHuPH20 soluble contiene un sitio NheI y una secuencia consenso de 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 de un sitio de restricción BamHI. Por tanto, el constructo pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24) 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:51), separados por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

Se sembraron células CHO DG44 no transfectadas que se hicieron crecer en medios CD-CHO modificados por GIBCO para las células DHFR(-), complementados con glutamina 4 mM y Pluronic F68/L 18 ml/l (Gibco), a $0,5 \times 10^6$ células/ml en un matraz de agitación en preparación para la transfección. Las células se hicieron crecer a 37°C en el 5% de CO₂ en una incubadora humidificada, agitando a 120 rpm. Se sometieron a prueba células CHO DG44 no transfectadas en crecimiento exponencial para determinar la viabilidad antes de la transfección.

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

Las células se retiraron de las cubetas después de la electroporación y se transfirieron a 5 ml de medios CD-CHO modificados para las células DHFR(-), complementados con glutamina 4 mM y Pluronic F68/L 18 ml/l (Gibco), y se dejaron crecer en un pocillo de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos sin selección durante 2 días a 37°C en el 5% de CO₂ en una incubadora humidificada.

Dos días después de la electroporación, se retiraron 0,5 ml de medios de cultivo tisular de cada pocillo y se sometieron a prueba para determinar la presencia de actividad hialuronidasa, usando el ensayo de microturbidez descrito en el ejemplo 9.

Tabla 1: Actividad hialuronidasa inicial de células CHO DG44 transfectadas con HZ24 40 horas después de la transfección		
	Dilución	Unidades de actividad/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 las células de la transfección 2 (350 V) del pocillo de cultivo tisular, 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 cien microlitros de medios CD-CHO (GIBCO) que contenían complemento GlutaMAX™-I 4 mM (GIBCO™, Invitrogen Corporation) y sin los complementos hipoxantina y timidina a los pocillos que contenían células (volumen final de 0,2 ml).

Se identificaron diez clones a partir de las 5 placas hechas crecer sin metotrexato.

Tabla 2. Actividad hialuronidasa de los clones identificados

ID de placa/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 matraces de agitación como suspensiones celulares individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 y 4D10 se sembraron en placas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos usando una estrategia de dilución infinita bidimensional en la que las células se diluyeron 1:2 a lo largo de la placa y 1:3 a lo ancho de la placa, comenzando a 5000 células en el pocillo superior a mano izquierda. Se hicieron crecer los clones diluidos en un fondo de 500 células CHO DG44 no transfectadas por pocillo, para proporcionar los factores de crecimiento necesarios para los días iniciales en cultivo. Se realizaron diez placas por subclón, con 5 placas que contenían metotrexato 50 nM y 5 placas sin metotrexato.

El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales (13 a partir del tratamiento sin metotrexato y 11 a partir del tratamiento con metotrexato 50 nM. Se midió una actividad hialuronidasa significativa en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (>50 Unidades/ml), y estos 8 subclones se expandieron en matraces de cultivo tisular T-25. Los clones aislados del protocolo de tratamiento con metotrexato se expandieron en presencia de metotrexato 50 nM. El clon 3D35M se expandió adicionalmente en metotrexato 500 nM, dando lugar a clones que producían más de 1.000 Unidades/ml en matraces de agitación (clon 3D35M; o 3D35M Gen1). Después se preparó un banco de células maestro (BCM) de las células 3D35M.

EJEMPLO 2

Determinación del número de copias de la región de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble en células 3D35M

Se determinó el número de copias de la región de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble en células 3D35M mediante PCR cuantitativa. Se extrajo ADN genómico total a partir de células 3D35M del BCM. Se prepararon seis diluciones independientes del ADN para su análisis por duplicado, que contenía cada una aproximadamente 6,6 ng de ADN (equivalentes a aproximadamente 100 células). También se prepararon controles negativos que no contenían molde, así como controles positivos que contenían el plásmido y el ADN equivalente de 1000 células CHO (6,6 ng). Las reacciones se ensamblaron según el protocolo de mezcla maestra de PCR universal TaqMan (Applied Biosystems) y se ejecutaron por duplicado. Se generó una curva de calibración usando ocho diluciones del plásmido HZ24, que representaban un intervalo de aproximadamente 5×10^6 a 49 copias de ADN plasmídico. Se diluyó el patrón en ADN genómico de control de CHO (equivalente de 100 células). Las reacciones se ensamblaron según el protocolo de mezcla maestra de PCR universal TaqMan™ (Applied Biosystems) usando el cebador directo HZM3.P1 y el cebador inverso HZM3.P2 (expuestos en las SEQ ID NO:52 y 53, respectivamente) y la sonda HZM3 (SEQ ID NO:54), que contenía los colorantes fluorescentes 6FAM (6-carboxifluoresceína) y TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina). Las reacciones se ejecutaron por duplicado usando las siguientes condiciones de ciclo: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. También se realizó una reacción de PCR cuantitativa convencional para someter a ensayo las copias de GAPDH para cada muestra de ADN. Se recopilaron los datos mediante el software de sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700™, versión 1.9 (Applied Biosystems).

Se calcularon los números de copias de genes diana por célula como la razón de copias diana (rHuPH20 soluble) con respecto a copias normalizadas (GAPDH) para las seis diluciones de ADN genómico de 3D35M. Se aplicó la prueba estadística de la Q de Dixon para valores extremos al conjunto de datos. Se halló que el número de copias de la región de sHuPH20 en células 3D35M era de $317,87 \pm 11,64$.

EJEMPLO 3 (COMPARATIVO)

Producción y purificación de rHuPH20 soluble del Gen1

A. Procedimiento en biorreactor de 5 l

Se descongeló un vial de 3D35M y se expandió a partir de matraces T-25 a matraces de centrifugación de 1 l en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) complementado con metotrexato 100 nM y 40 ml/l de GlutaMAX™-I (Invitrogen; disolución madre 200 mM). Se transfirieron las células de los matraces de centrifugación a un biorreactor de 5 l (Braun) a una densidad de inoculación de 4×10^5 células viables por ml en 5 l de medios. Los parámetros fueron punto de ajuste de temperatura de 37°C, pH de 7,2 (punto de ajuste de partida), con punto de ajuste de oxígeno disuelto del 25% y una superposición de aire de 0-100 cm³/min. A las 168 horas, se añadieron 250 ml de medio #1 de alimentación (CD CHO con 50 g/l de glucosa). A las 216 horas, se añadieron 250 ml de medio #2 de alimentación (CD CHO con 50 g/l de glucosa y butirato de sodio 10 mM) y a las 264 horas se añadieron 250 ml de medio #2 de alimentación. 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 fue para potenciar la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de producción.

Los medios acondicionados del clon 3D35M se clarificaron mediante filtración profunda y diafiltración de flujo tangencial en Hepes 10 mM, pH 7,0. Después se purificó la rHuPH20 soluble mediante cromatografía secuencial en intercambio iónico en Q Sepharose (Pharmacia), cromatografía de interacción hidrófoba en Phenyl Sepharose

(Pharmacia), boronato de aminofenilo (ProMedics) y cromatografía de hidroxiapatita (Biorad, Richmond, CA).

La rHuPH20 soluble se unió a Q Sepharose y 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 Phenyl Sepharose (low sub), seguido de la unión en las mismas condiciones a una resina de boronato de fenilo. La rHuPH20 soluble se eluyó a partir de la resina Phenyl Sepharose en Hepes pH 6,9 después de lavar a pH 9,0 en bicina 50 mM sin sulfato de amonio. Se cargó el eluato en una resina cerámica de hidroxiapatita 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 resultante presentaba una actividad específica de más de 65.000 Unidades/mg de proteína mediante el ensayo de microturbidez (véase el ejemplo 9). La rHuPH20 soluble purificada eluida como un único pico desde 24 hasta 26 minutos a partir de una columna de estireno-divinilbenceno Pharmacia 5RPC con un gradiente de entre el 0,1% de TFA/ H_2O y el 0,1% de TFA/el 90% de acetonitrilo/el 10% de H_2O y se resolvió como una única banda ancha de 61 kDa mediante electroforesis con SDS que se redujo hasta dar una banda nítida de 51 kDa tras el tratamiento con PNGasa-F. La secuenciación de los aminoácidos N-terminales reveló que el péptido líder se había retirado eficazmente.

B. Procedimiento de expansión de cultivo celular aguas arriba en un cultivo celular de biorreactor de 100 l

Se usó un procedimiento aumentado a escala para purificar por separado rHuPH20 soluble a partir de cuatro viales diferentes de células 3D35M para producir 4 lotes independientes de sHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C. Cada vial se expandió y cultivó por separado a través de un biorreactor de 125 l, después se purificó usando cromatografía en columna. Se tomaron muestras durante todo el procedimiento para evaluar parámetros tales como el rendimiento de enzima. La descripción del procedimiento proporcionado a continuación expone especificaciones representativas para cuestiones tales como los volúmenes iniciales del biorreactor y de los medios de alimentación, densidades celulares de transferencia y volúmenes de lavado y elución. Los números exactos varían ligeramente con cada lote, y se detallan en las tablas 3 a 10.

Se descongelaron cuatro viales de células 3D35M en un baño de agua a 37°C, se añadió CD CHO que contenía metotrexato 100 nM y 40 ml/l de GlutaMAX™-I y se centrifugaron las células. Se resuspendieron las células en un matraz de agitación de 125 ml con 20 ml de medios recién preparados y se colocaron en una incubadora a 37°C, el 7% de CO_2 . Se expandieron las células hasta 40 ml en el matraz de agitación de 125 ml. Cuando la densidad celular alcanzó $1,5 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo en un matraz de centrifugación de 125 ml en un volumen de cultivo de 100 ml. Se incubó el matraz a 37°C, el 7% de CO_2 . Cuando la densidad celular alcanzó $1,5 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo en un matraz de centrifugación de 250 ml en un volumen de cultivo de 200 ml y se incubó el matraz a 37°C, el 7% de CO_2 . Cuando la densidad celular alcanzó $1,5 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo en un matraz de centrifugación de 1 l en un volumen de cultivo de 800 ml y se incubó a 37°C, el 7% de CO_2 . Cuando la densidad celular alcanzó $1,5 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo en un matraz de centrifugación de 6 l en un volumen de cultivo de 5 l y se incubó a 37°C, el 7% de CO_2 . Cuando la densidad celular alcanzó $1,5 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo en un matraz de centrifugación de 36 l en un volumen de cultivo de 20 l y se incubó a 37°C, el 7% de CO_2 .

Se esterilizó un reactor de 125 l con vapor a 121°C, 20 PSI y se añadieron 65 l de medios CD CHO. Antes de su uso, se comprobó el reactor para determinar la contaminación. Cuando la densidad celular en los matraces de centrifugación de 36 l alcanzó $1,8 - 2,5 \times 10^6$ células/ml, se transfirieron 20 l de cultivo celular desde los matraces de centrifugación de 36 l al 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 de 50 rpm; presión del recipiente de 3 psi; burbujeo de aire de 1 l/min; superposición de aire: 1 l/min. Se tomaron muestras del reactor diariamente para determinar el recuento celular, la verificación del pH, el análisis de los medios, la producción y la retención de proteína. Se añadieron alimentaciones de nutrientes durante la ejecución. El día 6, se añadieron 3,4 l de medio #1 de alimentación (CD CHO + 50 g/l de glucosa + 40 ml/l de GlutaMAX™-I) y se cambió la temperatura de cultivo a 36,5°C. El día 9, se añadieron 3,5 l de alimentación #2 (CD CHO + 50 g/l de glucosa + 40 ml/l de GlutaMAX™-I + 1,1 g/l de butirato de sodio) y se cambió la temperatura de cultivo a 36°C. El día 11, se añadieron 3,7 l de alimentación #3 (CD CHO + 50 g/l de glucosa + 40 ml/l de GlutaMAX™-I + 1,1 g/l de butirato de sodio) y se cambió la temperatura de cultivo a 35,5°C. Se recogió el reactor a los 14 días o cuando la viabilidad de las células se encontraba 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 recogida, se tomaron muestras del cultivo para determinar micoplasma, carga biológica, endotoxina y virus *in vitro* e *in vivo*, microscopía electrónica de transmisión (TEM) para las partículas virales y actividad enzimática.

Se filtró el cultivo celular recogido del biorreactor de cien litros a través de una serie de filtros de cápsula desechables que tenían un medio de poliéter sulfona (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 Sartopore de 2000 cm^2 de 0,22 μm y en una bolsa de almacenamiento estéril de 100 l. Se concentró el cultivo 10 \times usando dos TFF con filtros de 30 kDa de MWCO de poliéter sulfona en espiral (Millipore), seguido de intercambio del tampón 6 \times con HEPES

10 mM, Na₂SO₄ 25 mM, pH 7,0 hacia un filtro final de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. La tabla 3 proporciona datos de monitorización relacionados con las etapas de cultivo celular, recogida, concentración e intercambio del tampón.

5 Tabla 3. Datos de monitorización para las etapas de cultivo celular, recogida, concentración e intercambio del tampón.

Parámetro	HUA0406C	HUA04010C	HUA0415C	HUA0420C
Tiempo desde la descongelación hasta la inoculación en el biorreactor de 100 l (días)	21	19	17	18
Densidad de inoculación en 100 l ($\times 10^6$ 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 máx. ($\times 10^6$ células/ml)	5,65	8,70	6,07	9,70
Viabilidad de la recogida (%)	41	48	41	41
Título de la recogida (U/ml)	1964	1670	991	1319
Tiempo en el biorreactor de 100 l (días)	13	13	12	13
Volumen de recogida clarificada (ml)	81800	93300	91800	89100
Ensayo enzimático de la recogida clarificada (U/ml)	2385	1768	1039	1425
Ensayo enzimático del concentrado (U/ml)	22954	17091	8561	17785
Ensayo enzimático del concentrado sometido a intercambio del tampón (U/ml)	15829	11649	9915	8679
Ensayo enzimático del concentrado sometido a intercambio del tampón filtrado (U/ml)	21550	10882	9471	8527
Volumen de concentrado sometido a intercambio del tampón (ml)	10699	13578	12727	20500
Razón en unidades de enzima de concentración/recogida	0,87	0,96	1,32	1,4

10 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 la endotoxina (ensayo de LAL). Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. Se cargó la recogida sometida a diafiltración concentrada en 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 en una bolsa estéril.

15 A continuación se realizó una cromatografía de interacción hidrófoba en Phenyl Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna 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 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 en la columna PS a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se añadió 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 la fracción no retenida a través de un filtro final de 0,22 µm en una bolsa estéril.

25 Se cargó la proteína purificada en PS en 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. Después 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 en 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.

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

40

Después se bombeó la proteína purificada en HAP a través de un filtro de eliminación de virus de 20 nM mediante un tanque de presión. Se añadió la proteína al tanque de presión DV20 y al filtro (Pall Corporation), que se hizo pasar a través de un filtro Ultipor DV20 con poros de 20 nm (Pall Corporation) en 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 ácido siálico y las impurezas relacionadas con el procedimiento. Después se concentró la proteína en el filtrado hasta 1 mg/ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocore Slice de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD (Sartorius). En primer lugar, se preparó el filtro lavando con una de disolución 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 del tampón 6× en la proteína concentrada con 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 en 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 4 a 10 proporcionan datos de monitorización relacionados con cada una de las etapas de purificación descritas anteriormente, para cada lote de células 3D35M.

Tabla 4. Datos de columna Q Sepharose

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de carga (ml)	10647	13524	12852	20418
Razón 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 de enzima (%)	65	107	87	76

Tabla 5. Datos de columna Phenyl Sepharose

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen antes de la adición de la disolución madre (ml)	5670	5015	5694	6251
Volumen de carga (ml)	7599	6693	7631	8360
Volumen de columna (ml)	9106	9420	9340	9420
Razón 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 de enzima (%)	102	88	82	96

Tabla 6. Datos de columna de boronato de aminofenilo

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de carga (ml)	16136	17958	16931	17884
Razón 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 de enzima (%)	no determinado	41	40	69

Tabla 7. Datos de columna de hidroxipatita

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen antes de la adición de la disolución madre (ml)	16345	20799	20640	19103
Razón 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 de enzima (%)	87	118	140	104

5 Tabla 8. Datos de filtración DV20

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (ml)	4077	2233	1917	2419
Volumen del 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 9. Datos de concentración final

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (ml)	4575	3298	2963	3492
Volumen del 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 10. Datos de intercambio del tampón en formulación final

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (ml)	562	407	237	316
Volumen final del concentrado sometido a intercambio del 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 cargó de manera aséptica la proteína rHuPH20 soluble purificada y concentrada en viales estériles con volúmenes de llenado de 5 ml y 1 ml. Se hizo pasar la proteína a través de un filtro de 0,22 μ m 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 aseguraron con tapas engarzadas. Se inspeccionaron visualmente los viales cerrados para determinar partículas extrañas y después se etiquetaron. Tras el etiquetado, se ultracongelaron los viales mediante inmersión en nitrógeno

líquido durante no más de 1 minuto y se almacenaron a $\leq 15^{\circ}\text{C}$ ($-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$). La producción y purificación de rHuPH20 soluble usando este método produjo aproximadamente 400-700 mg de rHuPH20 soluble con una actividad específica de 96.000 unidades/mg a 144.000 unidades/mg.

5 EJEMPLO 4

Producción de rHuPH20 soluble del Gen2

Se adaptó la línea celular 3D35M del Gen1 descrita anteriormente a mayores niveles de metotrexato para producir clones del Gen2. Se sembraron células 3D35M a partir de cultivos que contenían metotrexato establecidos en medio CD CHO que contenía GlutaMAX™-I 8 mM y metotrexato 1,0 μM . Se adaptaron las células a un mayor nivel de metotrexato haciéndolas crecer y pasar 9 veces durante un periodo de 46 días en una incubadora humidificada a 37°C , el 7% de CO_2 . Se clonó la población amplificada de células mediante dilución limitante en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían medio con metotrexato 2,0 μM . Después de aproximadamente 4 semanas, se identificaron los clones y se seleccionó el clon 3E10B para la expansión. Se hicieron crecer células 3E10B en medio CD CHO que contenía GlutaMAX™-I 8 mM y metotrexato 2,0 μM durante 20 pases, sometiendo a prueba para determinar la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripano y recuento con un hemocitómetro y la actividad enzimática mediante el ensayo de microturbidez (descrito a continuación en el ejemplo 9). Se creó un banco de células maestro (BCM) de la línea celular 3E10B y se congeló, y se usó para estudios posteriores.

La amplificación de la línea celular continuó cultivando células 3E10B en medio CD CHO que contenía GlutaMAX™-I 8 mM y metotrexato 4,0 μM . Después del 12° pase, se congelaron las células en viales como banco de células de investigación (RCB). Se descongeló un vial del RCB y se cultivó en medio que contenía metotrexato 8,0 μM . Después de 5 días, la concentración de metotrexato en el medio aumentó hasta 16,0 μM , después 20,0 μM 18 días más tarde. Se clonaron las células del 8° pase en 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™-I 4 mM y metotrexato 20,0 μM . Se identificaron los clones 1B3, 2B2 y 5C1 5-6 semanas más tarde. También se clonaron las células del 9° pase de 3D35M mediante dilución limitante en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con medio CD CHO que contenía GlutaMAX™-I 8 mM y metotrexato 20,0 μM , y se identificaron los clones 1G11, 2E10 y 2G10.

Se sembraron los cultivos celulares de cada uno de 1B3, 2B2, 5C1, 1G11, 2E10 y 2G10 a una densidad de 4×10^5 células/ml en un volumen de 50 ml en matraces de agitación de 250 ml. Se dejaron crecer y decrecer los cultivos sin alimentaciones adicionales durante 10-14 días para determinar la tasa de crecimiento y la productividad de las células. Se tomaron muestras periódicamente y se sometieron a ensayo para determinar la actividad hialuronidasa (tablas 11 y 12).

Tabla 11. Actividad hialuronidasa de células 1B3, 2B2 y 5C1

Horas tras la inoculación	Actividad enzimática de rHuPH20 soluble en cultivo celular (unidades)		
	1B3	2B2	5C1
74			382
95		942	
101			582
142		2287	
144	955		
169	1200		
195			
238	1611		
242			2139
265		3070	
336	2252		

40 Tabla 12. Actividad hialuronidasa de células 1B3, 2B2 y 2E10

Horas tras la inoculación	Actividad enzimática de rHuPH20 soluble en cultivo celular (unidades)		
	1B3	2B2	2E10
98	470		

123			1179
143		2228	
216			2814
290	2860		
291			2542
337		2992	

Se compararon cuatro líneas celulares (2B2, 2G10, 1G11 y 2E10) en un estudio en el que todas ellas se sembraron a una densidad de 4×10^5 células/ml en un volumen de 50 ml en un matraz de agitación de 250 ml. Todas recibieron alimentaciones al 10% (v/v) el día 8 y alimentaciones al 5% con medios de alimentación que contenían medio CD CHO complementado con 50 g/l de glucosa, 40 g/l de extracto de levadura y 1,1 g/l de butirato de sodio. Se recogieron las células el día 15. Se tomaron muestras periódicamente y se sometieron a ensayo para determinar la actividad enzimática de rHuPH20 soluble (tabla 13).

Tabla 13. Actividad hialuronidasa de células 2E10, 1G11, 2G10 y 2B2

Horas tras la inoculación	Actividad enzimática de rHuPH20 soluble en cultivo celular (unidades)			
	2E10	1G11	2G10	2B2
122	991	87	1688	
124				878
194	2151	1387	2430	
196				2642
285	6231	3831	7952	
287				8822
364	5880	2955	11064	
366				15684

Tanto en las condiciones discontinuas como en las semicontinuas, el cultivo de células 2B2 mostró una mayor actividad enzimática, aunque otras células (por ejemplo, células 2G10) también mostraron una buena productividad enzimática, por lo que se seleccionó la línea celular 2B2 para la expansión en medio que contenían metotrexato 20,0 μ M. Después del 11º pase, se congelaron las células 2B2 en viales como banco de células de investigación (RCB).

EJEMPLO 5

Actividad enzimática de rHuPH20 soluble producida en células 3E10B y 2B2

Se sometió a ensayo la rHuPH20 soluble producida por células 3E10B y 2B2 para determinar la actividad enzimática usando el ensayo de microturbidez (ejemplo 9). Se descongelaron viales congelados de bancos de células 3E10B y 2B2 y se cultivaron las células por separado durante dos pases en medio de crecimiento (medio CD CHO con GlutaMAX™-I 8 mM y o bien metotrexato 2,0 μ M para células 3E10B o bien metotrexato 20,0 μ M para células 2B2) en una incubadora humidificada a 37°C, el 6% de CO₂. Se inocularon las células en 20 ml de medio de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 125 ml (Corning) a 5×10^5 células/ml y se hicieron crecer durante 8 días en una incubadora humidificada a 37°C, el 6% de CO₂ con una plataforma agitadora que giraba a aproximadamente 100 rpm. Los días 8 y 10, los cultivos recibieron el 5% v/v de medio de alimentación que contenía medio CD CHO complementado con 50 g/l de glucosa, 50 g/l de extracto de levadura y 2,2 g/l (20 mM) de butirato de sodio para iniciar la fase de producción. Se tomaron muestras de los cultivos durante la fase de producción el día 8 (190 horas), el día 10 (240 horas), el día 14 (332 horas), el día 15 (258 horas), el día 16 (382 horas) y el día 18 (427 horas), y se dejó que la viabilidad disminuyera hasta cero. Después se analizaron las muestras para determinar la actividad hialuronidasa.

Las tablas 14 y 15 exponen la viabilidad (densidad de células viables (VCD) y porcentaje de viabilidad) y la actividad (unidades/matraz) de las células 3E10B y 2B2 en cada punto de tiempo. La actividad enzimática de rHuPH20 soluble producida por células 2B2 fue sistemáticamente mayor que la producida por células 3E10B. Por ejemplo, el día 8, la actividad enzimática de rHuPH20 soluble producida por células 2B2 fue un 69% mayor que la producida por células 3E10B (2484 unidades/ml en comparación con 1469 unidades/ml). Se observó una tendencia similar durante toda la fase de producción. La viabilidad de los cultivos celulares disminuyó a una tasa similar. Cuando se calculó la tasa de producción de las células, se observó que las células 3E10B produjeron 0,23 picogramos de rHuPH20 soluble por célula por día (pcd) el día 8 y 0,38 pcd el día 15. En comparación, las células 2B2 produjeron 0,46 picogramos de rHuPH20 soluble pcd el día 8 y 0,69 pcd el día 15, que fueron un 100% y un 82% mayores que la producción de 3E10B

los días 8 y 15, respectivamente. Después se preparó un banco de células maestro (BCM) de células 2B2 para estudios posteriores.

Tabla 14. Viabilidad y actividad del clon 3E10B

Horas tras la inoculación	VCD	% de viabilidad	Actividad (Unidades/ml)	Volumen (ml)
0	5	99	0	20
190	79,8	96	1469	20
240	61,6	76	2388	20
332	16,8	22	5396	20
358	16,4	17	5628	20
382	8,4	10	6772	20
427	0	0	6476	20
Actividad total (unidades) por matraz (U/ml por volumen (ml)): 129520				

Tabla 15. Viabilidad y actividad del clon 2B2

Horas tras la inoculación	VCD	% de viabilidad	Actividad (Unidades/matraz)	Volumen (ml)
0	5	99	0	20
190	68	94	2484	20
240	77,6	89	3532	20
332	32	38	8196	20
358	15,8	17	9680	20
382	9,8	13	10788	20
427	0	0	10044	20
Actividad total (unidades) por matraz (U/ml por volumen (ml)): 200880				

EJEMPLO 6

Pruebas de estabilidad genética de células 2B2

A. Determinación del número de copias de la región de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble en células 2B2

Se determinó el número de copias de la región de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble en células 2B2 mediante PCR. Se extrajo ADN genómico total a partir de 2×10^7 células 2B2 del BCM usando un kit QIAamp DNeasy (Qiagen). También se extrajo ADN genómico a partir de células CHO DG-44 como control negativo. Se verificó la pureza del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV. Para generar fragmentos de ADN (frente a ADN de alto peso molecular), se cortó el ADN genómico mediante sonicación. Esto garantizó un pipeteo más preciso y accesibilidad al molde. Se prepararon seis diluciones independientes del ADN genómico (hasta diluciones de cantidades equivalentes a aproximadamente 1000 células/ μ l) a partir de células 2B2 y DG-44 y se analizaron por duplicado en dos ensayos; un ensayo objetivo, que dirigió y amplificó una secuencia específica para la región de ácido nucleico que codifica para ADN plasmídico de rHuPH20 soluble, y un control endógeno, que dirigió y amplificó una secuencia de GAPDH. El control endógeno se usó como normalización de los resultados. El ensayo objetivo incluía una curva de calibración generada a partir de una dilución en serie de cantidades conocidas del plásmido HZ24 mezclado en ADN genómico de CHO DG-44. El control endógeno incluía una curva de calibración generada a partir de diluciones en serie de ADN genómico de CHO DG-44 mezclado con ADN del plásmido HZ24. Se supuso que el tamaño de genoma de mamífero era de 3×10^9 pares de bases. Cada ensayo incluía un control negativo (sin molde) y un control positivo (ADN del plásmido HZ24 para el ensayo objetivo y ADN de células huésped para el ensayo de normalización con control endógeno). Se prepararon las reacciones usando el cebador directo HZM3.P1 y el cebador inverso HZM3.P2 (expuestos en las SEQ ID NO:52 y 53, respectivamente) y la sonda HZM3 (SEQ ID NO:54), que contenía los colorantes fluorescentes 6FAM (6-carboxifluoresceína) y TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina). Se amplificaron las muestras usando el sistema de detección de secuencias Prism® 7900 de Applied Biosystems con condiciones de ciclo convencionales (50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 min, 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min durante 40 ciclos).

Se calcularon los números de copias de genes diana por célula como la razón de copias diana con respecto a copias normalizadas (GAPDH) para las seis diluciones de ADN genómico de 2B2. Se aplicó la prueba estadística de la Q de

Dixon para valores extremos al conjunto de datos. Se halló que el número de copias de la región de ácido nucleico que codifica para el plásmido de rHuPH20 soluble en células 2B2 era de $206,61 \pm 8,35$.

B. Análisis de secuencias de ARNm

Se determinó la secuencia del ARNm de PH20 generado a partir del plásmido HZ24 en células 2B2. Se extrajo ARN de 2×10^7 células 2B2 a partir del BCM usando un mini-kit RNeasy (Qiagen). Se trató la muestra con ADNasa I para retirar el ADN contaminante y se verificó la pureza del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV. Se realizó una reacción de transcripción inversa usando transcriptasa inversa SuperScript™ (Invitrogen) y una reacción de control sin transcriptasa inversa usando el ARN extraído y cebadores oligo d(t) y aleatorios. Después se usaron los productos de ADNc resultantes como moldes en amplificaciones por PCR. Se usaron dos conjuntos de pares de cebadores diferentes; AP01/AP03 y AP10/AP12. AP01/AP03 se diseñó para amplificar una región de 1719 pares de bases, mientras que el par de cebadores AP10/AP12 se diseñó para amplificar una región más amplia (1811 pares de bases) para obtener la secuencia de hebra inversa del extremo 3'. La tabla 5 expone las secuencias de los cebadores. Cada reacción de PCR incluía controles de cebador único, un control negativo que usa el control sin transcriptasa inversa (descrito anteriormente) como molde y un control positivo con cebadores de control y molde de control. Se visualizaron los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa y se confirmó que tenían el tamaño esperado, después se purificaron para retirar los cebadores en exceso y los dNTP mediante extracción en gel o EXOSAP (USB).

Se secuenciaron los productos purificados usando el kit de secuenciación de ciclo BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems) y los cebadores expuestos en la tabla 16. Se ensamblaron los datos de secuencia y se comparó la secuencia consenso derivada (SEQ ID NO:55) con la secuencia de referencia usando el software Sequencher, versión 4.1.2 (Gene Code Corporation). Se generaron un total de 1449 pares de bases de datos de secuencia. Se halló que la secuencia era idéntica a la secuencia de referencia (SEQ ID NO:47) excepto por una diferencia de pares de bases en la posición 1131, que se observó que era una timidina (T) en lugar de la citosina I esperada. Esta es una mutación silenciosa, sin ningún efecto sobre la secuencia de aminoácidos.

Tabla 16. Cebadores para la amplificación por PCR y la secuenciación

Nombre de cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
AP01	TTCTCTCCACAGGTGTC	56
AP02	AAGATTTCTTACAAGAC	57
AP03	TGGCGAGAGGGGAAAGAC	58
AP04	CCATTTATTTGAACACTC	59
AP06	CCGAACCTCGATTGCGCAC	60
AP07	AGCCATTCCCAAATTGTC	61
AP08	CTCCCAGTTCAATTACAG	62
AP09	CGTTAGCTATGGATCCTC	63
AP10	CGAGACAGAGAAGACTCTTGCG	64
AP12	CATTCAACAGACCTTGCAATTCC	65

C. Análisis por transferencia de tipo Southern de células 2B2

Se realizó un análisis por transferencia de tipo Southern en células 2B2 para obtener un mapa de estructura. Se extrajo ADN total a partir de 1×10^7 células 2B2 y 1×10^7 células DG-44 de control usando un sistema Maxwell 16® (Promega). Se evaluaron el ADN extraído y un constructo de control de plásmido HZ24 para determinar la pureza mediante electroforesis en gel de agarosa. Se digirió ADN a partir de células 2B2, células DG-44 y control de plásmido HZ24 con Spe I, Xba I y una digestión doble usando BamH I/Hind III. Se realizó otra digestión con BamH I/Hind en el control de plásmido HZ24 y se purificó aproximadamente 1,4 kb mediante extracción en gel y se marcó radiativamente con α - ^{32}P para generar una sonda marcada. Se sometieron a electroforesis aproximadamente 10 μg de cada uno de ADN de 2B2 y ADN de DG-44 digeridos y 10 μg de ADN de DG-44 con 250 pg de ADN de plásmido HZ24 en un gel de agarosa. Se tomó una imagen del gel tras la electroforesis, después se realizó una transferencia de tipo Southern. Se hibridó la membrana de nailon con la sonda marcada, después se lavó a temperatura ambiente durante 30 minutos, después dos veces a 55°C durante 30 minutos. Se expuso una autorradiografía inicial durante 24 horas y se inspeccionó visualmente. Se determinó que era necesaria una exposición más larga, de modo que se expuso una segunda autorradiografía durante 3 días durante una exposición más oscura de las bandas hibridadas. Después de desarrollar la película, se dimensionaron las bandas usando un dispositivo Alphamager® (Alpha Innotech).

No se observaron bandas de hibridación para la digestión de control negativo de DG-44 y se observaron bandas de hibridación únicas de tamaños esperados en las digestiones de HZ24 (digestión con BamH I/Hind III: ~1,4 kb; digestión

con Spe I: ~6,6 kb; digestión con Xba I: ~6,5 kb). Había una banda de hibridación principal de ~7,7 kb y cuatro bandas de hibridación secundarias (~13,9, ~6,6, ~5,7 y ~4,6 kb) observadas usando ADN de 2B2 digerido con Spe I, una banda de hibridación principal de ~5,0 kb y dos bandas de hibridación secundarias (~13,9 y ~6,5 kb) observadas usando ADN de 2B2 digerido con Xba I y una única banda de hibridación de ~1,4 kb observada usando ADN de 2B2 digerido con BamH I/Hind III. La presencia de la única banda de hibridación de ~1,4 kb en BamH I/Hind III indicó que no había inserciones o deleciones de secuencia grandes dentro de la región sondeada. Los resultados de las digestiones con Xba I y Spe I únicamente indican que hay múltiples sitios de integración del plásmido HZ24 en el genoma de las células 2B2.

EJEMPLO 7

Producción de rHuPH20 soluble del Gen2 en un cultivo celular de biorreactor de 30 l

Se produjo y purificó rHuPH20 soluble a partir de células 2B2 usando un biorreactor de 36 l (30 l de volumen de cultivo) para determinar los procedimientos óptimos para aumentar la escala hasta un biorreactor de 400 l (300 l de volumen de cultivo). A continuación se detalla, en las secciones A D, cuatro ejecuciones en un biorreactor de 36 l independientes.

A. Producción y caracterización de los lotes 056-099 y 056-100 de rHuPH20 soluble

Se descongeló un vial de 2B2 (1×10^7 células) y se cultivó a 37°C, el 7% de CO₂ durante 8 pases en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con metotrexato 20 µM y 40 ml/l de GlutaMAX™-I (Invitrogen), después de lo cual se expandió hasta 600 ml. Una semana más tarde, se expandió el cultivo hasta 5 l en medio CD CHO complementado con 40 ml/l de GlutaMAX™-I y sin metotrexato. Se inoculó un biorreactor de 36 l que contenía 25 l de medio CD CHO complementado con 1 l de GlutaMAX™-I y 30 ml de sulfato de gentamicina con el cultivo de 5 l a una densidad de siembra inicial de $3,6 \times 10^5$ célula/ml. El punto de ajuste de agitación del biorreactor se estableció en 75 RPM; temperatura: 37°C; pH: 7,15; oxígeno disuelto: 30%. El biorreactor recibió una superposición de aire filtrado y un burbujeo de aire/oxígeno/CO₂, tal como se controla mediante un controlador Applikon.

Se alimentó el cultivo 7 veces durante toda la ejecución en el biorreactor, a las 161, 184, 237, 256, 280, 304 y 328 horas tras la inoculación. Se filtraron los medios de alimentación en el biorreactor mediante una bomba peristáltica. El contenido de cada medio de alimentación y los parámetros de alimentación del biorreactor durante toda la ejecución se proporcionan en las tablas 17 y 18, respectivamente.

Tabla 17. Formulaciones de los medios de alimentación

Componente	Alimentación #1	Alimentación #2	Alimentación #3	Alimentación #4	Alimentación #5	Alimentación #6	Alimentación #7
Medio líquido CD CHO	1 l	1 l	1 l	1 l	1 l	1 l	1 l
GlutaMAX™-I	120 ml	80 ml	40 ml	40 ml	40 ml	30 ml	30 ml
Polvo AGT de CD CHO	48,6 g	24,3 g	0	0	0	0	0
Yeastolate ultrafiltrado (200 g/l)	150 ml	300 ml	300 ml	150 ml	150 ml	0	0
Butirato de sodio	1,65 g	2,35 g	1,65 g	1,65 g	1,65 g	1,65 g	1,65 g

Tabla 18. Parámetros del biorreactor

Horas	VCD	% de viabilidad	pH	Unidades de hialuronidasa	Vol. (l)	Glucosa	Alimentación
0	3,6	97	7,28	0	31	6000	-
15	6,2	94	7,45	117	31	5780	-
44	11,3	97	7,15	290	31	5320	-
88	25,6	97	6,85	517	31	3430	-
115	42,6	95	6,75	1132	31	2920	-
139	56,4	96	6,74	1320	31	2220	-
161	71,9	97	6,82	2296	31	520	Alimentación #1

184	83,9	96	6,81	2748	32	610	Alimentación #2
213	82,7	96	6,87	3396	33	1190	-
237	80,5	89	7,21	4450	33	200	Alimentación #3
256	62,3	71	7,03	4750	34	240	Alimentación #4
280	52,7	66	7,01	5030	35	600	Alimentación #5
304	44,6	59	7,00	5970	36	560	Alimentación #6
328	33,3	47	7,00	7240	37	570	Alimentación #7
351	26,1	34	7,00	7360	37	250	-

Se recogió el biorreactor y se filtró a través de un sistema que contenía una serie de filtros de cápsula (Sartorius) con tamaños de poro de 8 μm , 0,65 μm , 0,45 μm y 0,22 μm , respectivamente. La recogida se realizó usando una bomba peristáltica y se completó en aproximadamente 5 horas, produciendo aproximadamente 32 l de líquido de cultivo celular recogido (HCCF). Se complementó el HCCF con EDTA y Tris hasta concentraciones finales de 10 mM cada uno, pH 7,6. Después se almacenó el HCCF a 2-8°C antes de concentrarlo y someterlo a intercambio del tampón.

Para concentrar la proteína, en primer lugar se equilibró un cartucho enrollado en espiral de Millipore de 2,5 ft² con un MWCO de 30 kDa en NaCl 150 mM, Hepes 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5. Se concentraron 15 l de HCCF 15× hasta 1 l. Se sometió a intercambio del tampón el concentrado 10× con el tampón NaCl 150 mM, Hepes 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5 y se filtró el retenido a través de una cápsula de 0,2 μm en una bolsa de almacenamiento de 2 l, para un volumen final de 1,1 l. Después se almacenó el retenido a 2-8°C.

Después se purificó la disolución de proteína concentrada y sometida a intercambio del tampón usando cromatografía en columna a través de una columna Q Sepharose, una columna Phenyl Sepharose, una columna de aminofenilo y una columna de hidroxipatita. Se evaluaron las unidades de hialuronidasa en la disolución de proteína antes y después de cada etapa de cromatografía y se usaron para determinar el rendimiento de cada etapa.

En resumen, se higienizó una columna Q Sepharose con un lecho de columna de 1,1 l con 2,8 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Después se limpió con 2,5 l de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, se enjuagó en 4,1 l de agua estéril para inyección (SWFI) y se equilibró con 2,5 l de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0. Se cargó la proteína sometida a intercambio del tampón (1 l a 170.160 unidades/ml) en la columna. La fracción no retenida fue 1,0 l a 479 unidades/ml, lo que indica que prácticamente todo el producto se unió a la resina. Se lavó la columna con 4 l de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0, y 4,2 l de Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. Después se eluyó el producto en 3,0 l de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, produciendo 3 l a 49.940 unidades/ml, y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm .

Se higienizó una columna Phenyl Sepharose con un lecho de columna de 2,1 l con 4,8 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Después se enjuagó con 5,0 l de SWFI y se limpió con 4,6 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y se enjuagó de nuevo con 6,8 l de SWFI. Después se equilibró la columna en 5,5 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. Al eluato de la columna Q Sepharose, se le añadieron 10,3 ml de fosfato monobásico de potasio 1 M, 10,3 ml de fosfato dibásico de potasio 1 M y 0,42 ml de CaCl₂ 1 mM. Después se cargó esto en la columna y se recogieron la fracción no retenida y el retenido (1 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 mM), produciendo 7,4 l a 20.030 unidades/ml. Se filtró el producto a través de un filtro de 0,2 μm .

Se higienizó una columna de boronato de aminofenilo con un lecho de columna de 1,8 l con 4,5 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Después se enjuagó con 3,9 l de SWFI, se limpió con 4,2 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y se enjuagó de nuevo con 4,0 l de SWFI. Después se equilibró la columna con 7,5 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. Después se cargó el material de la fracción no retenida de la columna Phenyl Sepharose en la columna de boronato de aminofenilo después de complementarse con sulfato de amonio hasta una concentración final de 0,5 M. Se lavó la columna con 6,5 l de fosfato de potasio 5 mM, pH 7,0, después con 7,8 l de bicina 20 mM, pH 9,0, después con 9,0 l de bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0. Se eluyó el producto con 4,8 l de Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, dando como resultado 4,8 l a 22.940 unidades/ml, y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm .

Se higienizó una columna de hidroxipatita con un lecho de columna de 0,8 l con 2,7 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Se neutralizó la columna con 2,1 l de fosfato de potasio 200 mM, pH 7,0, después se equilibró en 2,2 l de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM. Al eluato de la columna de boronato de aminofenilo, se le añadieron 9,1 ml de fosfato monobásico de potasio 1 M, 9,1 ml de fosfato dibásico de potasio 1 M y 0,452 ml de CaCl₂ 1 mM. Después se cargó esto en la columna y la fracción no retenida fue de 4,5 l a 10 unidades/ml, lo que indica una buena unión de la HuPH20 soluble. Se lavó la columna con 3,3 l de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, después con 2,9 l de fosfato de potasio 10 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. Se eluyó el producto con 1,0 l de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0, dando como resultado 1 l a 130.000 unidades/ml, y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm .

Se concentró el producto purificado usando un cartucho de 30 kDa de MWCO de Millipore de 2,5 ft² que se había equilibrado en NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0. Se concentró el producto hasta 74 ml y se sometió a intercambio del tampón 10× con el tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0, después se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Se realizaron mediciones de A₂₈₀ e indicaron que la concentración de proteína era de 11,3 mg/ml. Se usaron 9,6 ml adicionales de tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0 para llevar la concentración de proteína hasta 10 mg/ml (lote 056-99). Se diluyeron diez ml de la disolución de proteína de 10 mg/ml en el tampón para producir una disolución de 1 mg/ml (lote 056-100). Ambas disoluciones se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

Se cargó el producto formulado en viales de vidrio de 10 ml y 1 ml, cuyo total combinado produjo 761 mg de rHuPH20 soluble. Se congelaron los viales a -80°C, después se transfirieron hasta -20°C para su almacenamiento. Después se caracterizaron los lotes 056-99 y 056-100 con respecto a la actividad y la pureza. Los lotes 056-99 y 056-100 mostraron una actividad enzimática de 1.350.786 unidades/ml y 129.982 unidades/ml y una actividad específica de 130.00 unidades/mg y 124.00 unidades/mg (calculada a partir de la actividad enzimática y la concentración de proteína). Se determinó la pureza de las muestras de rHuPH20 soluble mediante SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), cromatografía de líquidos de alta presión de fase inversa (RP-HPLC), cromatografía de exclusión molecular (SEC) y cromatografía de intercambio aniónico. Tal como se determina mediante RP-HPLC, se observó que la pureza de los dos lotes era de aproximadamente el 95%. Tal como se determina mediante SEC, se observó que la pureza de los dos lotes era de aproximadamente el 99%. Se mostró que los niveles de endotoxina eran ≤0,5 UE/ml y 0,1 UE/ml para los lotes 056-99 y 056-100, respectivamente. Se midió que la osmolaridad era de 271 mOsm/kg y 291 mOsm/kg para los lotes 056-99 y 056-100, respectivamente.

B. Modificaciones para aumentar la producción de rHuPH20 soluble: lote 2B2-20K.5 de biorreactor

Se realizaron modificaciones al método descrito anteriormente en la sección A. Estas modificaciones estaban destinadas a aumentar el rendimiento del producto y mejorar la eficiencia y escalabilidad de fabricación. Las etapas de fabricación descritas a continuación incluyen la descongelación de las células congeladas a partir del banco de células de investigación, la expansión de las células en cultivo continuo, la operación de sistema de biorreactor semicontinuo, la recogida y la clarificación del líquido de cultivo celular y la concentración y el intercambio del tampón del producto a granel. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, la adición de insulina humana recombinante al medio del biorreactor para aumentar la tasa de crecimiento y los niveles de expresión de producto de las células. Además, se ha reducido el número de alimentaciones desde 7 hasta 5. También se realizaron otras modificaciones de los métodos descritos anteriormente.

Se descongeló un vial de 2B2 (1 × 10⁷ células) y se cultivó en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con metotrexato 20 µM y 40 ml/l de GlutaMAX™-I (Invitrogen), después de lo cual se expandió hasta 100 ml, 450 ml y después hasta 4,5 l en medio CD CHO complementado con 40 ml/l de GlutaMAX™-I y sin metotrexato. Se inoculó un biorreactor de 36 l que contenía 20 l de medio CD CHO complementado con 800 l de GlutaMAX™-I, 30 ml de sulfato de gentamicina y 100 mg de insulina humana recombinante con 3,6 l de cultivo de 2B2 a una densidad de siembra inicial de 4,3 × 10⁵ célula/ml. El punto de ajuste de agitación del biorreactor se estableció en 80 RPM; temperatura: 37°C; pH: 7,15; oxígeno disuelto: 25%. El biorreactor recibió una superposición de aire filtrado y un burbujeo de aire/oxígeno/CO₂, tal como se controla mediante un controlador Applikon.

Se alimentó el cultivo 5 veces durante toda la ejecución de 13 días en el biorreactor, a las 117, 143, 196, 235 y 283 horas tras la inoculación. Se filtraron los medios de alimentación en el biorreactor mediante una bomba peristáltica. El contenido de cada medio de alimentación y los parámetros de alimentación del biorreactor durante toda la ejecución se proporcionan en las tablas 19 y 20, respectivamente.

Tabla 19. Formulaciones de los medios de alimentación

Componente	Medio inicial del biorreactor	Alimentación #1	Alimentación #2	Alimentación #3	Alimentación #4	Alimentación #5
Medio líquido CD CHO	12 l	0	0	0	0	0
GlutaMAX™-I	800 ml	120 ml	80 ml	40 ml	40 ml	40 ml
Polvo AGT de CD CHO	194,4 g	97,2 g	48,6 g	24,3 g	24,3 g	24,3 g
SWFI	8 l	800 ml	900 ml	700 ml	700 ml	700 ml
Yeastolate ultrafiltrado (200 g/l)	0	0	0	200 ml	200 ml	200 ml

Dextrosa	0	30 g	60 g	40 g	40 g	40 g
Gentamicina	30 ml	0	0	0	0	0
rHuInsulina	25 ml	0	0	0	0	0
Butirato de sodio	0	0	0	2,2 g	1,1 g	1,1 g

Tabla 20. Parámetros del biorreactor

Horas	VCD	% viabilidad	pH	Unidades de hialuronidasa	Vol. (l)	Glucosa	Alimentación
0	4,3	98	7,28	0	25	8820	-
55	17,1	99	7,07	580	25	4950	-
94	40,6	99	6,77	1059	25	3800	-
117	57,5	99	6,76	1720	25	2310	Alimentación #1
143	88,8	99	6,75	3168	26	2770	Alimentación #2
167	93,7	99	6,80	6982	27	3830	-
196	96,2	97	6,89	4560	27	2060	Alimentación #3
222	78,9	85	6,83	4920	28	2720	-
235	80	76	6,81	5670	28	1870	Alimentación #4
260	54,3	65	6,76	5865	29	2930	-
283	38,7	44	6,73	6540	29	1880	Alimentación #5
308	37,3	39	6,78	8460	29	2400	-
313	33,7	34	6,78	8190	29	2300	-

- 5 Se recogió el biorreactor y se filtró a través de un sistema que contenía una serie de filtros Millipore Pod D0HC (0,5 m²) y apilamientos A1HC, que contenían capas de tierra de diatomeas de tamaño de poro graduado, seguido de una filtración final a través de un filtro de cápsula (Sartorius Sartobran 300) en una bolsa de almacenamiento de 50 l. La recogida se realizó usando una bomba peristáltica y se completó en aproximadamente 2 horas, produciendo aproximadamente 30 l de líquido de cultivo celular recogido (HCCF). Se complementaron veintiocho litros de HCCF con EDTA y Tris hasta concentraciones finales de 10 mM cada uno y un pH 7,5. Los 2 l de HCCF restantes se dejaron sin Tris/EDTA, para evaluar el efecto de la adición de Tris/EDTA sobre la etapa de concentración/intercambio del tampón. Después se almacenó el HCCF a 2-8°C antes de concentrarlo y someterlo a intercambio del tampón.

- 15 Para concentrar la proteína, en primer lugar se equilibró un casete de malla Pellicon 2 biomax A de Millipore de 0,1 m² con un MWCO de 30 kDa en Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se concentraron 2 l de HCCF con y sin Tris/EDTA 10× y se sometieron a intercambio del tampón 10× con el tampón Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se midieron los niveles de proteína mediante absorbancia a A₂₆₀. Después se concentró el HCCF restante (aproximadamente 26,5 l) y se sometió a intercambio del tampón. Se ensamblaron dos casetes de malla Pellicon 2 biomax A de Millipore de 0,1 m² con un MWCO de 30 kDa en el sistema de TFF y se equilibraron en Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se concentró el HCCF aproximadamente 10× hasta 2,5 l y se sometió a intercambio del tampón 10× con Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se filtró el retenido a través de un filtro de vacío de 0,2 µm en bolsas de almacenamiento de 1 l y de 500 ml, para un volumen final de 2,6 l. Después se almacenó el retenido a 2-8°C. Se analizaron las muestras tomadas durante el procedimiento de concentración e intercambio del tampón mediante RP-HPLC para determinar el efecto de la adición de Tris/EDTA a la muestra. Se observó que la adición de Tris/EDTA facilitó una etapa de procesamiento más eficiente.

C. Producción y caracterización de los lotes 056-122 y 056-123 de rHuPH20 soluble (lote 2B2-20K.6 de biorreactor).

- 30 Se incorporaron las modificaciones descritas anteriormente en la sección C en las etapas de fabricación para producir y purificar dos lotes de rHuPH20 soluble; lotes 056-122 y 056-123. El procedimiento descrito a continuación incluye la descongelación de células congeladas a partir del banco de células de investigación HZ24-2B2; la expansión de células en cultivo continuo; la operación de sistema de biorreactor semicontinuo de 36 l a escala de 30 l; la retirada de células, la clarificación y el intercambio del tampón del producto a granel; cromatografía en columna de 4 etapas; y las operaciones de formulación, llenado y acabado.

- 35 Se descongeló un vial de 2B2 (1 × 10⁷ células) y se cultivó a 37°C, el 7% de CO₂ en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con metotrexato 20 µM y 40 ml/l de GlutaMAX™-I (Invitrogen), después de lo cual se expandió hasta 400 ml, después hasta 4,4 l en medio CD CHO complementado con 40 ml/l de GlutaMAX™-I y sin metotrexato.

Se inoculó un biorreactor de 36 l (serie Bellco 1964) que contenía 20 l de medio CD CHO complementado con 800 l de GlutaMAX™-I, 100 mg de insulina humana recombinante y 30 ml de sulfato de gentamicina con el cultivo de 4 l a una densidad de siembra inicial de $4,9 \times 10^5$ células/ml. El punto de ajuste de agitación del biorreactor se estableció en 80 RPM; temperatura: 37°C; pH: 7,15; oxígeno disuelto: 25%. El biorreactor recibió una superposición de aire filtrado y un burbujeo de aire/oxígeno/CO₂, tal como se controla mediante un controlador Applikon ADI 1030.

Se alimentó el cultivo 4 veces durante toda la ejecución de 13 días en el biorreactor, a las 127, 163, 208 y horas tras la inoculación. Se filtraron los medios de alimentación en el biorreactor mediante una bomba peristáltica. El punto de ajuste de temperatura del biorreactor se redujo desde 37°C hasta 36,5°C el día 7, hasta 36,0°C el día 9 y finalmente hasta 35,5°C el día 11. El contenido de cada medio de alimentación y los parámetros de alimentación del biorreactor durante toda la ejecución se proporcionan en las tablas 21 y 22, respectivamente.

Tabla 21. Formulaciones de los medios de alimentación

Componente	Medio inicial del biorreactor	Alimentación #1	Alimentación #2	Alimentación #3	Alimentación #4
Polvo AGT de CD CHO (Invitrogen; parte #:10743-029; lote # 1366333)	0	97,2 g	48,6 g	24,3 g	24,3 g
Polvo AGT de CD CHO (Invitrogen; parte #:10743-029; lote # 1320613)	267,3 g	0	0	0	0
Polvo AGT de CD CHO (Invitrogen; parte #:12490-017; lote # 1300803)	218,7 g	0	0	0	0
SWFI	20 l	700 ml	700 ml	600 ml	600 ml
GlutaMAX™-I (Invitrogen)	800 ml	160 ml	80 ml	60 ml	40 ml
Yeastolate ultrafiltrado (Invitrogen; 200 g/l)	0	100 ml	200 ml	300 ml	300 ml
Dextrosa (D-glucosa)	0	40 g	40 g	60 g	40 g
Gentamicina	30 ml	0	0	0	0
rHuInsulina	100 mg	40 mg	0	0	0
Butirato de sodio	0	0	1,1 g	2,2 g	1,1 g

Tabla 22. Parámetros del biorreactor

Horas	Densidad de células viables ($\times 10^5$ células/ml)	% de viabilidad	pH	Unidades de hialuronidasa	Vol. (l)	Glucosa	Alimentación
0	4,9	92	7,26	79	25	7780	-
24	9,2	95	7,21	141	25	6060	-
48	17,3	97	7,13	243	25	5280	-
72	33	99	6,82	407	25	3910	-
98	49,3	99	6,77	658	25	3200	-
127	67	98	6,83	1296	25	1610	Alimentación #1
144	88,1	98	6,78	1886	26	2860	-
163	92,4	99	6,89	2439	26	1680	Alimentación #2
192	91	97	6,85	3140	27	1480	-
208	92,7	96	6,91	3188	27	230	Alimentación #3
235	70	76	6,86	5118	28	1940	-

261	63	61	6,84	5862	28	280	Alimentación #4
291	36,4	45	6,76	7072	29	1570	-
307	29,3	32	6,81	8160	29	1250	Recogida

Se recogió el biorreactor y se filtró a través de un sistema que contenía una serie de filtros Millipore Pod D0HC (0,5 m²) y apilamientos A1HC (0,1 m²), que contenían capas de tierra de diatomeas de tamaño de poro graduado, seguido de una filtración final a través de un filtro de cápsula (Sartorius Sartobran 300) en bolsas de almacenamiento de 20 l. La recogida se realizó usando una bomba peristáltica y se completó en aproximadamente 1 hora, produciendo aproximadamente 34 l de líquido de cultivo celular recogido (HCCF). Este incluye los 29 l de volumen de biorreactor más aproximadamente 5 l de retenido en PBS. Se complementó el HCCF con EDTA y Tris hasta concentraciones finales de 10 mM cada uno y un pH final de 7,5. Después se almacenó el HCCF a 2-8°C antes de concentrarlo y someterlo a intercambio del tampón.

Para concentrar la proteína, en primer lugar se equilibró un casete de flujo cruzado Sartocon 2 de Sartorius de 7,0 ft² con un MWCO de 30 kDa en Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se concentraron 34 l de HCCF 10× hasta 3 l y se sometieron a intercambio del tampón 10× con el tampón Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se filtró el retenido a través de un filtro de cápsula de 0,2 µm en una bolsa de almacenamientos de 5 l para un volumen final de 3,0 l. Después se almacenó el retenido a 2-8°C.

Después se purificó la disolución de proteína concentrada y sometida a intercambio del tampón usando cromatografía en columna a través de una columna Q Sepharose, una columna Phenyl Sepharose, una columna de aminofenilo y una columna de hidroxiapatita. Se evaluaron las unidades de hialuronidasa en la disolución de proteína antes y después de cada etapa de cromatografía y se usaron para determinar el rendimiento de cada etapa.

En resumen, se higienizó una columna Q Sepharose con un lecho de columna de 1,1 l, diámetro de 7 cm, altura de 28 cm con 2,1 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Después se limpió con 2,5 l de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, se enjuagó en 4,5 l de agua estéril para inyección (SWFI) y se equilibró con 4,3 l de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0. Se cargó la proteína sometida a intercambio del tampón (3 l a 94.960 unidades de hialuronidasa /ml) en la columna. La fracción no retenida y el primer lavado eran 5830 ml a 75 unidades de hialuronidasa /ml, lo que indica que prácticamente todo el producto (99,8%) se unió a la resina. Se lavó la columna con 4,2 l de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0 y 4,6 l de Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. Después se eluyó el producto en 2,9 l de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, produciendo 2880 ml a 96.080 unidades/ml, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Se higienizó una columna Phenyl Sepharose con un lecho de columna de 2,2 l (altura de 28 cm, diámetro de 10 cm) con 5,0 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Después se enjuagó con 4,5 l de SWFI y se limpió con 4,6 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y se enjuagó de nuevo con 6,8 l de SWFI. Después se equilibró la columna en 4,6 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 mM. Al eluato de la columna Q Sepharose, se le añadieron 9,6 ml de fosfato monobásico de potasio 1 M, 9,6 ml de fosfato dibásico de potasio 1 M y 0,4 ml de CaCl₂ 1 mM. Después se cargó esto en la columna y se recogieron la fracción no retenida y el retenido (fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 mM), produciendo 6905 ml a 36.280 unidades/ml. Se filtró el producto a través de un filtro de 0,2 µm.

Se higienizó una columna de boronato de aminofenilo con un lecho de columna de 2,2 l (altura de 29 cm, diámetro de 10 cm) con 3,8 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Después se enjuagó con 5,0 l de SWFI, se limpió con 5,0 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y se enjuagó de nuevo con 5,0 l de SWFI. Después se equilibró la columna con 5,0 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. Después se cargó el material filtrado de la columna Phenyl Sepharose en la columna de boronato de aminofenilo. Se lavó la columna con 9,9 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, después con 9,7 l de bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0, después con 9,9 l de bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9,0. Se eluyó el producto con 5,0 l de Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, dando como resultado 4460 ml a 48.400 unidades/ml, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Se higienizó una columna de hidroxiapatita con un lecho de columna de 1,1 l (diámetro de 7 cm, altura de 28 cm) con 2,7 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Se neutralizó la columna con 2,1 l de fosfato de potasio 200 mM, pH 7,0, después se equilibró en 2,2 l de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM. Al eluato de la columna de boronato de aminofenilo, se le añadieron 11,2 ml de fosfato monobásico de potasio 1 M, 11,2 ml de fosfato dibásico de potasio 1 M y 0,45 ml de CaCl₂ 1 mM. Después se cargó esto en la columna y posteriormente se lavó con 3,5 l de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, después con 3,5 l de fosfato de potasio 10 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. Se eluyó el producto con 1,4 l de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0, dando como resultado 1260 ml a 152.560 unidades/ml, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Se concentró el producto purificado usando un cartucho de Millipore de 0,05 ft² de 30 kDa de MWCO que se había equilibrado en NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0. Se concentró el producto desde 1250 ml a 1,04/mg/ml hasta 120

ml y se sometió a intercambio del tampón 10× con el tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0, después se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Se realizaron mediciones de A₂₈₀ e indicaron que la concentración de rHuPH20 soluble de los 118 ml restantes era de 11,45 mg/ml. Se añadieron 17 ml adicionales de tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0 para llevar la concentración de proteína hasta 10 mg/ml (lote 056-122). Se diluyeron diez ml de la disolución de proteína de 10 mg/ml en el tampón para producir una disolución de 1 mg/ml (lote 056-123). Ambas disoluciones se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

Se cargó el producto formulado en viales de vidrio de 10 ml y 1 ml, cuyo total combinado produjo 1308 mg de rHuPH20 soluble. Se congelaron los viales a -80°C, después se transfirieron hasta -20°C para su almacenamiento. Después se caracterizaron los lotes 056-122 y 056-123 con respecto a la actividad y la pureza. Los lotes 056-122 y 056-123 mostraron una actividad enzimática de 1.376.992 unidades/ml y 129.412 unidades/ml y una actividad específica de 136.900 unidades/mg y 124.400 unidades/mg (calculada a partir de la actividad enzimática y la concentración de proteína). Se determinó la pureza de las muestras de rHuPH20 soluble mediante SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), cromatografía de líquidos de alta presión de fase inversa (RP-HPLC), cromatografía de exclusión molecular (SEC) y cromatografía de intercambio aniónico. Tal como se determina mediante RP-HPLC, se observó que la pureza de los dos lotes era de aproximadamente el 96,2%. Tal como se determina mediante SEC, se observó que la pureza de los dos lotes era mayor del 99%. Se mostró que los niveles de endotoxina eran ≤0,8 UE/ml y 0,09 UE/ml para los lotes 056-122 y 056-123, respectivamente. Se midió que la osmolaridad era de 265 mOsm/kg y 256 mOsm/kg para los lotes 056-122 y 056-123, respectivamente. El pH de cada uno era de 7,2.

D. Reproducibilidad del procedimiento de producción de rHuPH20 soluble del Gen2 en un cultivo celular de biorreactor de 30 l

Se usó el procedimiento descrito anteriormente para el lote 2B2-20K.6 para un lote posterior para demostrar la reproducibilidad del procedimiento. Se modificó el procedimiento ligeramente mediante la incorporación de una etapa de inactivación viral inmediatamente antes de las etapas de cromatografía en columna.

Se descongeló un vial de células 2B2 (1×10^7 células) y se cultivó a 37°C, el 7% de CO₂ durante 7 pases en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con metotrexato 20 µM y 40 ml/l de GlutaMAX™-I (Invitrogen), después de lo cual se expandió hasta 400 ml, después hasta 4,4 l en medio CD CHO complementado con 40 ml/l de GlutaMAX™-I y sin metotrexato. Se inoculó un biorreactor de 36 l (serie Belco 1964) que contenía 20 l de medio CD CHO complementado con 800 ml de GlutaMAX™-I, 100 mg de insulina humana recombinante y 300 mg de sulfato de gentamicina con 3 l de cultivo a una densidad de siembra inicial de $4,7 \times 10^5$ célula/ml. El punto de ajuste de agitación del biorreactor se estableció en 80 RPM; temperatura: 37°C; pH: 7,15; oxígeno disuelto: 25%. El biorreactor recibió una superposición de aire filtrado y un burbujeo de aire/oxígeno/CO₂, tal como se controla mediante un controlador Applikon ADI 1030.

Se alimentó el cultivo 4 veces durante toda la ejecución de 13 días en el biorreactor, a las 127, 163, 208 y horas tras la inoculación. Se filtraron los medios de alimentación en el biorreactor mediante una bomba peristáltica. El punto de ajuste de temperatura del biorreactor se redujo desde 37°C hasta 36,5°C el día 7, hasta 36,0°C el día 9 y finalmente hasta 35,5°C el día 11. El contenido de cada medio de alimentación y los parámetros de alimentación del biorreactor durante toda la ejecución se proporcionan en las tablas 23 y 24, respectivamente.

Tabla 23. Formulaciones de los medios de alimentación

Componente	Medio inicial del biorreactor	Alimentación #1	Alimentación #2	Alimentación #3	Alimentación #4
Medio líquido CD CHO (Invitrogen)	20 l	0	0	0	0
Polvo AGT de CD CHO	0 g	97,2 g	48,6 g	24,3 g	24,3 g
SWFI	0	700 ml	700 ml	600 ml	600 ml
GlutaMAX™-I (Invitrogen)	800 ml	160 ml	80 ml	60 ml	40 ml
Yeastolate ultrafiltrado (Invitrogen; 200 g/l)	0	100 ml	200 ml	300 ml	300 ml
Dextrosa (D-glucosa)	0	40 g	40 g	60 g	50 g
Gentamicina	300 mg	0	0	0	0
rHuInsulina	100 mg	40 mg	0	0	0
Butirato de sodio	0	0	1,1 g	2,2 g	1,1 g

Tabla 24. Parámetros del biorreactor

Horas	Densidad de células viables ($\times 10^5$ células/ml)	% de viabilidad	pH	Unidades de hialuronidasa	Vol. (l)	Glucosa	Alimentación
0	4,7	98	7,28	113	24	8200	-
24	8,9	98	7,23	202	24	6160	-
50	19,3	97	7,15	332	24	5480	-
76	36,7	99	6,85	680	24	3620	-
120	73,6	99	6,76	1619	24	2100	Alimentación #1
145	84,3	99	6,75	2842	25	2660	-
165	98,8	99	6,87	3756	25	840	Alimentación #2
190	95,3	99	6,85	4773	26	1330	-
201	105	97	6,90	5484	26	270	Alimentación #3
214	95,9	93	6,82	6344	27	2590	-
242	81,2	81	6,75	7890	27	1350	Alimentación #4
268	51,9	48	6,65	10398	28	2500	-
287	38,4	41	6,70	11864	28	2170	-
308	31,6	31	6,66	12864	28	1850	Recogida

Se recogió el biorreactor y se filtró a través de un sistema que contenía una serie de filtros Millipore Pod D0HC (0,5 m²) y apilamientos A1HC (0,1 m²), que contenían capas de tierra de diatomeas de tamaño de poro graduado, seguido de una filtración final a través de un filtro de cápsula (Sartorius Sartobran 300) en bolsas de almacenamiento de 20 l. La recogida se realizó usando una bomba peristáltica y se completó en aproximadamente 75 minutos, produciendo aproximadamente 30 l de líquido de cultivo celular recogido (HCCF). Este incluye los 28 l de volumen de biorreactor más aproximadamente 2 l de retenido en PBS. Se complementó el HCCF con EDTA y Tris hasta concentraciones finales de 10 mM cada uno y un pH final de 7,5. Después se almacenó el HCCF a 2-8°C antes de concentrarlo y someterlo a intercambio del tampón.

Para concentrar la proteína, en primer lugar se equilibró un sistema Sartorius Slice con 3× casetes de flujo cruzado Sartocon Slice de 1,0 ft² (30 kDa de MWCO) en Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. Se concentraron treinta litros de HCCF 10× hasta 3 l y se sometieron a intercambio del tampón 10× con el tampón Na₂SO₄ 20 mM, Tris 10 mM, pH 7,5. La velocidad de flujo promedio durante la concentración fue de 115 ml/minuto y la presión transmembrana promedio fue de 16 psig. La velocidad de flujo promedio durante la diafiltración fue de 150 ml/minuto y la presión transmembrana promedio fue de 15 psig. Se filtró el retenido a través de sistema de filtros de vacío de 0,2 µm en una bolsa de almacenamiento de 5 l para un volumen final de 3,0 L. Después se almacenó el retenido a 2-8°C.

Se realizó la inactivación viral mezclando 235 ml de una disolución filtrada de Triton X-100 al 10% p/p, fosfato de tributilo al 35% p/p en SWFI con 2,15 l de proteína concentrada a temperatura ambiente y sometida a intercambio del tampón en un matraz de centrifugación de vidrio con agitación a 30-40 rpm. Después de 45 minutos, se cargó la disolución de proteína en la columna Q Sepharose (tal como se describe a continuación). La carga duró 24 minutos, lo que dio como resultado un tiempo de exposición total a la disolución de detergente de 69 minutos.

Se higienizó la columna Q Sepharose con un lecho de columna de 1,1 l, diámetro de 7 cm, altura de 28 cm con 2,1 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Después se limpió con 2,5 l de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, se enjuagó en 4,5 l de agua estéril para inyección (SWFI) y se equilibró con 4,5 l de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0. Se cargó la proteína sometida a inactivación viral e intercambio del tampón (2385 ml a 133.040 unidades de hialuronidasa /ml) en la columna. Se lavó la columna con 4,5 l de Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0 y 4,5 l de Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. Después se eluyó el producto en 2,5 l de Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0, produciendo 2500 ml a 133.680 unidades/ml, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Se higienizó una columna Phenyl Sepharose con un lecho de columna de 2,2 l (altura de 28 cm, diámetro de 10 cm) con 5,0 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Después se enjuagó con 6,0 l de SWFI y se equilibró en 4,6 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 mM. Para eluir la columna, se añadieron 9,6 ml de fosfato monobásico de potasio 1 M, 9,6 ml de fosfato dibásico de potasio 1 M y 0,4 ml de CaCl₂ 1 mM. Después se cargó esto en la columna y se recogieron la fracción no retenida y el retenido (fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 mM), produciendo 6450 ml a 43.840 unidades/ml. Se filtró el producto a través de un filtro de 0,2 µm.

Se higienizó una columna de boronato de aminofenilo con un lecho de columna de 2,2 l (altura de 29 cm, diámetro de 10 cm) con 3,5 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Después se enjuagó con 5,0 l de

SWFI y se equilibró con 9,0 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. Después se cargó el material de la fracción no retenida de la columna Phenyl Sepharose en la columna de boronato de aminofenilo. Se lavó la columna con 9,9 l de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, después con 9,9 l de bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0. Se eluyó el producto con 4,4 l de Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, produciendo 4389 ml a 33.840 unidades/ml, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Se higienizó una columna de hidroxiapatita con un lecho de columna de 1,1 l (diámetro de 7 cm, altura de 28 cm) con 2,1 l de NaOH 1,0 N y se almacenó en NaOH 0,1 N antes de su uso. Se neutralizó la columna con 3,6 l de fosfato de potasio 200 mM, pH 7,0, después se equilibró en 3,2 l de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM. Al eluato de la columna de boronato de aminofenilo, se le añadieron 11 ml de fosfato monobásico de potasio 1 M, 11 ml de fosfato dibásico de potasio 1 M y 0,44 ml de CaCl₂ 1 mM. Después se cargó esto en la columna y posteriormente se lavó con 4,8 l de fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, después con 3,8 l de fosfato de potasio 10 mM, NaCl 100 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. Se eluyó el producto con 1,5 l de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0, dando como resultado 1500 ml a 114.320 unidades/ml, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

Se concentró el producto purificado usando un cartucho de Millipore de 0,05 ft² de 30 kDa de MWCO que se había equilibrado en NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0. Se concentró el producto desde 1500 ml a 0,961 mg/ml hasta 125 ml y se sometió a intercambio del tampón 10× con el tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0, después se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Se realizaron mediciones de A₂₈₀ e indicaron que la concentración de proteína de los 122 ml restantes era de 11,431 mg/ml. Se añadieron 17,5 ml adicionales de tampón NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0 para llevar la concentración de proteína hasta 10 mg/ml (lote 056-135). Se diluyeron diez ml de la disolución de proteína de 10 mg/ml en el tampón para producir una disolución de 1 mg/ml (lote 056-136). Ambas disoluciones se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

Se cargó el producto formulado en viales de vidrio de 5 ml y 1 ml, cuyo total combinado produjo 1324 mg de rHuPH20 soluble. Se congelaron los viales a -80°C, después se transfirieron hasta -20°C para su almacenamiento. Después se caracterizaron los lotes 056-135 y 056-136 con respecto a la actividad y la pureza. Los lotes 056-135 y 056-136 mostraron una actividad enzimática de 1.301.010 unidades/ml y 127.661 unidades/ml y una actividad específica de 121.600 unidades/mg y 127.700 unidades/mg (calculada a partir de la actividad enzimática y la concentración de proteína). Se determinó la pureza de las muestras de rHuPH20 soluble mediante SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), cromatografía de líquidos de alta presión de fase inversa (RP-HPLC), cromatografía de exclusión molecular (SEC) y cromatografía de intercambio aniónico. Tal como se determina mediante RP-HPLC, se observó que la pureza de los dos lotes estaba entre el 93,5% y el 93,7%. Tal como se determina mediante SEC, se observó que la pureza de los dos lotes era mayor del 99%. Se mostró que los niveles de endotoxina eran ≤0,84 UE/ml y 0,09 UE/ml para los lotes 056-135 y 056-136, respectivamente. Se midió que la osmolaridad era de 255 mOsm/kg y 260 mOsm/kg para los lotes 056-135 y 056-136, respectivamente. El pH de cada uno era de 7,2.

EJEMPLO 8

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

Se aumentaron a escala los métodos de producción y purificación detallados en el ejemplo 7 anterior para la producción usando un biorreactor de 400 l. Se descongeló un vial de células 2B2 (1×10^7 células) y se expandió a partir de matraces de agitación a matraces de centrifugación de 36 l en CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con metotrexato 20 µM y GlutaMAX™-I 8 mM (Invitrogen). En resumen, se descongeló un vial de células en un baño de agua a 37°C, se añadieron medios y se centrifugaron las células. Se resuspendieron las células en un matraz de agitación de 125 ml con 20 ml de medios recién preparados y se colocaron en una incubadora a 37°C, el 7% de CO₂. Se expandieron las células hasta 40 ml en el matraz de agitación de 125 ml. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/ml, se expandió el cultivo en un matraz de centrifugación de 125 ml en un volumen de cultivo de 100 ml. Se incubó el matraz 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 en un matraz de centrifugación de 250 ml en un volumen de cultivo de 200 ml y se incubó el matraz 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 en un matraz de centrifugación 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 en un matraz de centrifugación 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 en un matraz de centrifugación 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 con vapor a 121°C durante 30 minutos y se añadieron 230 ml de medios CD CHO complementados con GlutaMAX™-I 8 mM y 5 mg/l de rHuInsulina. Antes de su uso, se comprobó el reactor para determinar la contaminación. Se transfirieron aproximadamente 30 l de células desde los matraces de centrifugación 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 de 40-55 RPM; presión del recipiente: 3 psi; burbujeo de aire de 0,5-1,5 l/min; superposición de aire: 3 l/min. Se tomaron muestras del reactor diariamente para determinar el recuento celular, la verificación del pH, el análisis de los medios, la producción

y la retención de proteína. Además, se añadieron alimentaciones de nutrientes durante la ejecución. A las 120 h (día 5), se añadieron 10,4 l de medio #1 de alimentación (4× CD CHO + 33 g/l de glucosa + 160 ml/l de GlutaMAX™-I + 16,6 g/l de Yeastolate + 33 mg/l de rHuInsulina). A las 168 horas (día 7), se añadieron 10,8 l de alimentación #2 (2× CD CHO + 33 g/l de glucosa + 80 ml/l de GlutaMAX™-I + 33,4 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio) y se cambió la temperatura de cultivo a 36,5°C. A las 216 horas (día 9), se añadieron 10,8 l de alimentación #3 (1× CD CHO + 50 g/l de glucosa + 50 ml/l de GlutaMAX™-I + 50 g/l de Yeastolate + 1,80 g/l de butirato de sodio) y se cambió la temperatura de cultivo a 36°C. A las 264 horas (día 11), se añadieron 10,8 l de alimentación #4 (1× CD CHO + 33 g/l de glucosa + 33 ml/l de GlutaMAX™-I + 50 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio) 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 etapas finales de producción. Se recogió el reactor a los 14 días o cuando la viabilidad de las células se encontraba 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 recogida, se tomaron muestras del cultivo para determinar micoplasma, carga biológica, endotoxina y virus *in vitro* e *in vivo*, TEM para las partículas virales y actividad enzimática.

Se bombeó el cultivo mediante una bomba peristáltica a través de cuatro módulos de sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, conteniendo cada uno una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana de celulosa, después a través de un segundo y único sistema de filtración Millistak (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 de una membrana de celulosa, y después a través de un filtro final de 0,22 µm en una bolsa flexible estéril de un solo uso con una capacidad de 350 l. Se complementó el líquido de cultivo celular recogido con EDTA 10 mM y Tris 10 mM a un pH de 7,5. Se concentró el cultivo 10× con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) modelo usando cuatro filtros de poliéter sulfona (PES) de corte de peso molecular (MWCO) de 30 kDa para TFF Sartoslice (Sartorius), seguido de intercambio del tampón 10× con Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 en un filtro final de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento de 50 l estéril.

Se sometió a inactivación viral la recogida sometida a diafiltración concentrada. 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 recogida sometida a diafiltración concentrada 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.

B. Purificación de sHuPH20 del Gen2

Se preparó una columna de intercambio iónico 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 endotoxina (ensayo de 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 recogida sometida a diafiltración concentrada en 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 en una bolsa estéril. Se sometió a prueba la muestra de eluato para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática. Se tomaron lecturas de absorbancia A₂₈₀ al principio y al final del intercambio.

A continuación se realizó una cromatografía de interacción hidrófoba en Phenyl Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna 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 endotoxina (ensayo de 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 anterior 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 en 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 la fracción no retenida a través de un filtro final de 0,22 µm en una bolsa estéril. Se tomaron muestras de la fracción no retenida para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Se preparó una columna de boronato de aminofenilo (ProMedics; 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 endotoxina (ensayo de 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 proteína purificada en PS en la columna de boronato de aminofenilo a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. Se lavó la columna con bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0. Se lavó la columna con bicina 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 9,0. Se eluyó la proteína con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6,9 y se hizo pasar a través de un filtro estéril en una bolsa estéril. Se sometió a prueba la muestra eluida para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Se preparó la columna de hidroxiapatita (HAP) (BioRad; 13 l de resina, H = 20 cm, D = 30 cm). Se recogió el lavado y se sometió a prueba para determinar el pH, la conductividad y endotoxina (ensayo de 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 CaCl_2 0,1 mM y se cargó en la columna de HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM. A continuación se lavó la columna con fosfato de potasio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl_2 0,1 mM. Se eluyó la proteína con fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 y se hizo pasar a través de un filtro estéril de 0,22 μm en una bolsa estéril. Se sometió a prueba la muestra eluida para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Después se hizo pasar la proteína purificada en HAP a través de un filtro de eliminación de virus. En primer lugar se preparó el filtro Virosart esterilizado (Sartorius) 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 mediante una bomba peristáltica a través del filtro de eliminación de virus de 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 en una bolsa estéril. Se sometió a prueba la muestra filtrada de virus para determinar la concentración de proteína, la actividad enzimática, el perfil de oligosacáridos, monosacáridos y ácido siálico (tal como se describe en los ejemplos 9 a 10 a continuación).

Después se concentró la proteína en el filtrado hasta 10 mg/ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocon Slice de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD (Sartorius). En primer lugar se preparó el filtro 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 realizó un intercambio del tampón 6x en la proteína concentrada en el tampón final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0. Tras el intercambio del tampón, se hizo pasar la proteína concentrada a través de un filtro de 0,22 μm en 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 (tal como se describe en los ejemplos 9 a 10 a continuación).

Después se dispuso de manera aséptica la proteína a granel filtrada estéril a 20 ml en viales de Teflon estériles de 30 ml (Nalgene). Después se ultracongelaron los viales y se almacenaron a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$. La producción y purificación de rHuPH20 soluble usando este método produjeron aproximadamente 11 y 15 gramos, con una actividad específica de 95.000 unidades/mg a 120.000 unidades/mg.

C. Comparación de la producción y purificación de sHuPH20 del Gen1 y Gen2

Se compararon la producción y purificación de rHuPH20 soluble del Gen2 en un cultivo celular de biorreactor de 300 l, que contenía algunos cambios en los protocolos, con la producción y purificación de rHuPH20 soluble del Gen1 en un cultivo celular de biorreactor de 100 l (descrito en el ejemplo 4). La tabla 25 expone diferencias a modo de ejemplo, además de cambios a escala sencillos, entre los métodos.

Tabla 25. Diferencias a modo de ejemplo entre la producción y purificación de rHuPH20 soluble del Gen1 y Gen2 usando los métodos de cultivo celular de los biorreactores de 100 l y 300 l

Diferencia entre procedimientos	rHuPH20 soluble del Gen1	rHuPH20 soluble del Gen2
Línea celular	3D35M	2B2
Medios usados para expandir el inóculo celular	Contiene metotrexato 0,10 μM (0,045 mg/l)	Contiene metotrexato 20 μM (9 mg/l)
Medios en cultivo de 6 l en adelante	Contiene metotrexato 0,10 μM	No contiene metotrexato
Matraz de centrifugación de 36 l	Sin instrumentación Volumen de operación de 20 l	Equipado con instrumentación que monitoriza y controla el pH, el oxígeno disuelto, el burbujeo y la velocidad de flujo del gas de salida. Volumen de operación de 32 l
Volumen de operación 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)
Medios de cultivo en el biorreactor final	Sin rHuInsulina	5,0 mg/l de rHuInsulina

ES 2 981 983 T3

Volumen de alimentación medios	de	Escalado 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 objetivo de ~92 l.	Escalado 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 objetivo de ~303 l.
Alimentación medios	de	<p>Medio #1 de alimentación: CD CHO + 50 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 8 mM</p> <p>Alimentación #2 (CD CHO + 50 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 8 mM + 1,1 g/l de butirato de sodio</p> <p>Alimentación #3: CD CHO + 50 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 8 mM + 1,1 g/l de butirato de sodio</p>	<p>Medio #1 de alimentación: 4× CD CHO + 33 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 32 mM + 16,6 g/l de Yeastolate + 33 mg/l de rHuInsulina</p> <p>Alimentación #2: 2× CD CHO + 33 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 16 mM + 33,4 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio</p> <p>Alimentación #3: 1× CD CHO + 50 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 10 mM + 50 g/l de Yeastolate + 1,80 g/l de butirato de sodio</p> <p>Alimentación #4: 1× CD CHO + 33 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 6,6 mM + 50 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio</p>
Filtración de cultivo celular de biorreactor		<p>Cuatro filtros de poliéter sulfona (8,0 µm, 0,65 µm, 0,22 µm y 0,22 µm) en serie</p> <p>Bolsa de almacenamiento de 100 l</p>	<p>1ª etapa - 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 de una membrana de celulosa.</p> <p>2ª etapa - módulo único 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 de una membrana de celulosa.</p> <p>3ª etapa - filtro de poliéter sulfona de 0,22 µm</p> <p>Bolsa de almacenamiento de 300 l</p> <p>El cultivo celular recogido se complementa con EDTA 10 mM, Tris 10 mM a un pH de 7,5.</p>
Concentración e intercambio del tampón antes de la cromatografía		<p>Concentrado con 2 TFF con filtro de 30 K de MWCO de poliéter sulfona en espiral de Millipore</p> <p>Intercambio del tampón al concentrado 6× con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0</p> <p>Bolsa de almacenamiento estéril de 20 l</p>	<p>Concentrado usando cuatro filtros de 30 K de MWCO para TFF Sartoslice de Sartorius</p> <p>Intercambio del tampón al concentrado 10× con Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5</p> <p>Bolsa de almacenamiento estéril de 50 l</p>

Inactivación viral antes de la cromatografía	Ninguna	Inactivación viral realizada con la adición de 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 de A ₂₈₀ al principio y al final
Filtración viral después de la cromatografía	Filtro DV-20 de Pall (20 nm)	Filtro Virosart de Sartorius (20 nm)
Concentración e intercambio del tampón después de la 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
Llenado de viales	Volúmenes de llenado de 5 ml y 1 ml Almacenados a - ≤30°C Vidrio/tapón de caucho	Volúmenes de llenado de 20 ml Almacenados a ≤20°C Teflon/tapa engarzada
Rendimiento de rHuPH20 soluble	Aproximadamente 400-700 mg	Aproximadamente 11-25 g

EJEMPLO 9

Determinación de la actividad enzimática de rHuPH20 soluble

5

Se determinó la actividad enzimática de rHuPH20 soluble en muestras tales como cultivos celulares, fracciones de purificación y disoluciones purificadas usando un ensayo turbidimétrico, que se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con albúmina sérica. La actividad se mide incubando rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo establecido (10 minutos) y después precipitando el hialuronato de sodio sin digerir con la adición de albúmina sérica acidificada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un periodo de desarrollo de 30 minutos. La disminución de la turbidez resultante de la actividad enzimática en el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática de rHuPH20 soluble. El método se ejecuta usando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de trabajo de ensayo de rHuPH20 soluble, y las mediciones de actividad de la muestra se realizan en relación con esta curva de calibración.

15

Se prepararon diluciones de la muestra en disoluciones de diluyente de enzimas. La disolución de diluyente de enzimas se preparó disolviendo $33,0 \pm 0,05$ mg de gelatina hidrolizada en 25,0 ml del tampón de reacción PIPES 50 mM (NaCl 140 mM, PIPES 50 mM, pH 5,5) y 25,0 ml de SWFI y diluyendo 0,2 ml de disolución de Buminat al 25% en la mezcla y agitando en vórtex durante 30 segundos. Esto se realizó en el plazo de 2 horas de uso y se almacenó en hielo hasta que se necesitó. Se diluyeron las muestras hasta aproximadamente 1-2 U/ml. En general, la dilución máxima por etapa no superó 1:100 y el tamaño de muestra inicial para la primera dilución no fue menor de 20 µl. Los volúmenes mínimos de muestra necesarios para realizaron el ensayo fueron: muestras en el procedimiento, fracciones de FPLC: 80 µl; sobrenadantes de cultivo tisular: 1 ml; material concentrado: 80 µl; material purificado o de etapa final: 80 µl. Las diluciones se realizaron por triplicado en una placa de 96 pocillos de baja unión de proteínas, y se transfirieron 30 µl de cada dilución a placas de fondo negro/transparente Optilux (BD BioSciences).

25

Se prepararon diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2,5 U/ml en disolución de diluyente de enzimas para generar una curva de calibración y se añadieron 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 µl de disolución de diluyente de enzimas en la placa como control negativo. Después 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. Después de la agitación, se devolvió la placa al bloque térmico y se sensibilizó el dispositivo de manipulación de líquidos MULTIDROP 384 con la disolución caliente de hialuronato de sodio 0,25 mg/ml (preparada disolviendo 100 mg de hialuronato de sodio (LifeCore Biomedical) en 20,0 ml de SWFI. Esta se mezcló mediante rotación y/o movimiento suave a 2-8°C durante 2-4 horas, o hasta que se disolvió por completo). Se transfirió la placa de reacción al dispositivo MULTIDROP 384 y se inició la reacción presionando la tecla de inicio para dispensar 30 µl de hialuronato de sodio en cada pocillo. Después se retiró la placa del dispositivo MULTIDROP 384 y se agitó durante 10 segundos antes de transferirla a un bloque térmico con la cubierta de la placa reemplazada. Se incubó la placa a 37°C durante 10 minutos

40

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

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

EJEMPLO 10

Determinación del contenido de ácido siálico y monosacáridos

El contenido de ácido siálico y monosacáridos de rHuPH20 soluble puede evaluarse mediante cromatografía de líquidos de fase inversa (RPLC) tras la hidrólisis con ácido trifluoroacético. En un ejemplo, se determinó el contenido de ácido siálico y monosacáridos del lote #HUB0701E de hialuronidasa purificada (1,2 mg/ml; producida y purificada esencialmente tal como se describió en el ejemplo 8). En resumen, se hidrolizaron 100 µg de muestra con ácido trifluoroacético al 40% (v/v) a 100°C durante 4 horas por duplicado. Tras la hidrólisis, se secaron las muestras y se resuspendieron en 300 µl de agua. Se transfirió una alícuota de 45 µl de cada muestra resuspendida a un tubo nuevo y se secó, y se añadieron 10 µl de una disolución de acetato de sodio 10 mg/ml a cada uno. Se marcaron de manera fluorescente los monosacáridos liberados mediante la adición de 50 µl de una disolución que contenía ácido 2-aminobenzoico 30 mg/ml, cianoborohidruro de sodio 20 mg/ml, acetato de sodio aproximadamente 40 mg/ml y ácido bórico 20 mg/ml en metanol. Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 80°C en la oscuridad. Se extinguió la reacción de derivatización mediante la adición de 440 µl de fase móvil A (n-butilamina al 0,2% (v/v), ácido fosfórico al 0,5% (v/v), tetrahidrofurano al 1% (v/v)). También se hidrolizó y derivatizó un blanco de matriz de agua tal como se describe para la muestra de hialuronidasa como control negativo. Se separaron los monosacáridos liberados mediante RPLC usando una columna de fase inversa de octadecilo (C₁₈) (4,6 x 250 mm, tamaño de partícula de 5 µm; J.T. Baker) y se monitorizaron mediante detección por fluorescencia (360 nm de excitación, 425 nm de emisión). Se realizó la cuantificación del contenido de monosacáridos comparando los cromatogramas de la muestra de hialuronidasa con los cromatogramas de los patrones de monosacáridos incluyendo *N*-D-glucosamina (GlcN), *N*-D-galactosamina (GalN), galactosa, fucosa y manosa. La tabla 26 presenta la razón molar de cada monosacárido por molécula de hialuronidasa.

Tabla 26. Contenido de monosacáridos de rHuPH20 soluble

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

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

EJEMPLO 11

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

Se realizó la secuenciación C-terminal en dos lotes de sHuPH20 producida y purificada a partir de células 3D35M en un volumen de biorreactor de 100 l (lote HUA0505MA) y células 2B2 en un volumen de biorreactor de 300 l (lote HUB0701EB). Se digirieron por separado los lotes con endoproteinasa Asp-N, que escinde específicamente los enlaces peptídicos N-terminales a ácido aspártico y cisteico. Esto libera la porción C-terminal de la rHuPH20 soluble en el ácido aspártico en la posición 431 de SEQ ID NO:4. Se separaron y caracterizaron los fragmentos C-terminales para determinar la secuencia y abundancia de cada población en el lote HUA0505MA y el lote HUB0701EB.

Se observó que las preparaciones de rHuPH20 soluble a partir de células 3D35M y células 2B2 presentaban heterogeneidad y contenían polipéptidos que diferían entre sí en su secuencia C-terminal (tablas 27 y 28). Esta heterogeneidad es probablemente el resultado de la escisión C-terminal del polipéptido de 447 aminoácidos expresado (SEQ ID NO:4) mediante las peptidasas presentes en el medio de cultivo celular u otras disoluciones durante el procedimiento de producción y purificación. Los polipéptidos en las preparaciones de rHuPH20 soluble tienen las secuencias de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1-447, 1-446, 1-445, 1-444 y 1-443 de la secuencia de rHuPH20 soluble expuesta SEQ ID NO:4. La secuencia de aminoácidos completa de cada uno de estos polipéptidos se expone en las SEQ ID NO:4 a 8, respectivamente. Tal como se indica en las tablas 27 y 28, la abundancia de cada

polipéptido difiere en las preparaciones de rHuPH20 soluble a partir células 3D35M y células 2B2.

Tabla 27. Análisis de los fragmentos C-terminales del lote HUA0505MA

Fragmento	Posición de aminoácido (en relación con SEQ ID NO:4)	Secuencia	Masa teórica	Masa exp.	Error	Tiempo de elución	Abundancia
D28a	431-447	DAFKLPPMETEEPQIFY (SEQ ID NO:66)	2053,97	2054,42	0,45	99,87	0,2%
D28b	431-446	DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO:67)	1890,91	1891,28	0,37	97,02	18,4%
D28c	431-445	DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO:68)	1743,84	1744,17	0,33	86,4	11,8%
D28d	431-444	DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO:69)	1630,70	1631,07	0,32	74,15	56,1%
D28e	431-443	DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO:70)	1502,70	1502,98	0,28	77,36	13,6%
D28f	431-442	DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO:71)	1405,64	ND	N/A	N/A	0,0%

5

Tabla 28. Análisis de los fragmentos C-terminales del lote HUB0701EB

Fragmento	Posición de aminoácido (en relación con SEQ ID NO:4)	Secuencia	Masa teórica	Masa exp.	Error	Tiempo de elución	Abundancia
D28a	431-477	DAFKLPPMETEEPQIFY (SEQ ID NO:66)	2053,97	2054,42	0,45	99,89	1,9%
D28b	431-446	DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO:67)	1890,91	1891,36	0,45	96,92	46,7%
D28c	431-445	DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO:68)	1743,84	1744,24	0,40	85,98	16,7%
D28d	431-444	DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO:69)	1630,70	1631,14	0,39	73,9	27,8%
D28e	431-443	DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO:70)	1502,70	1503,03	0,33	77,02	6,9%
D28f	431-442	DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO:71)	1405,64	ND	N/A	N/A	0,0%

EJEMPLO 12

10

Producción y purificación de rHuPH20 soluble en cultivo celular de biorreactor de 2500 l

15

La producción y purificación de rHuPH20 soluble puede aumentarse a escala desde un procedimiento de biorreactor semicontinuo de 300 l (descrito en el ejemplo 8) hasta un procedimiento de biorreactor semicontinuo de 2500 l. Al igual que la producción de rHuPH20 en un cultivo celular de biorreactor de 300 l, la producción de rHuPH20 en un cultivo celular de biorreactor de 2500 l se realiza, en primer lugar, descongelando y expandiendo un vial de células 2B2, cultivando en un biorreactor, recogiendo y clarificando el cultivo, concentrando y sometiendo a intercambio del tampón la recogida, seguido de inactivación viral. Después se purifica la rHuPH20 a partir del concentrado usando una serie de etapas de purificación que utilizan Q Sepharose, Phenyl Sepharose, boronato de aminofenilo y boronato de hidroxipatita, seguido de filtración viral.

20

1. Expansión del cultivo celular

25

Para generar mayores números de células requeridos para la siembra del cultivo celular de biorreactor de 2500 l en comparación con el cultivo de 300 l, se expande en serie el cultivo celular a través de un matraz de agitación de 125 ml, un matraz de agitación de 250 ml, un matraz de agitación de 1 l, dos matraces de agitación de 2 l, seis matraces de agitación de 2 l, un dispositivo WAVE Biorreactor™ de 25 l (GE Healthcare Life Sciences), un dispositivo WAVE

Biorreactor™ de 100 l y un biorreactor de siembra de tanque agitado de 600 l (ABEC, Inc. Bethlehem, PA; Stainless Technology division). En cada expansión, la densidad de siembra objetivo es de 4×10^5 células/ml. La temperatura durante toda la expansión es de 37°C (o entre 36°C y 38°C) con el 7% de CO₂ (o entre el 6-8% de CO₂). Se agitan los matraces a aproximadamente 110 RPM (o 90-130 RPM), se mueven los dispositivos WAVE Biorreactor™ de 25 l y 100 l a 20 RPM (o 15-25 ó 18-22 RPM, respectivamente) y se agita el biorreactor de siembra de 600 l a 90 RPM (u 85-95 RPM).

En primer lugar, se descongela un vial de células 2B2 (1×10^7 células) a partir del banco de células de trabajo en un baño de agua a 37°C durante aproximadamente 2 minutos (preferiblemente no más de 5 minutos) antes de añadir los medios y se centrifugan las células. Se resuspenden las células hasta aproximadamente 25 ml (o entre 20-30 ml) con medios recién preparados (CD CHO AGT™ con 40 ml/l de GlutaMAX™-I (8 mM) y metotrexato 20 µM) en un matraz de agitación de 125 ml y se colocan en una incubadora a 37°C, el 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanza aproximadamente 8×10^5 células/ml, se transfiere el cultivo a un matraz de agitación de 250 ml en un volumen de cultivo de 50 ml (o 45-55 ml). Tras la incubación, cuando la densidad celular alcanza aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células/ml, se expande el cultivo en un matraz de 1 l en un volumen de cultivo de 200 ml (o 190-210 ml) y se incuba. Cuando la densidad celular en el matraz de 1 l alcanza aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células/ml, se expande el cultivo en 2 matraces de 2 l, cada uno con un volumen de cultivo total de aproximadamente 400 ml (o entre 350-450 ml por matraz) y se incuba. Cuando la densidad celular en los matraces de 2 l alcanza aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células/ml, se expande el cultivo en 6 matraces de 2 l, cada uno con un volumen de cultivo total de aproximadamente 400 ml (o entre 350-450 ml por matraz) y se incuba. Cuando la densidad celular en los matraces de 2 l alcanza aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml, se expande el cultivo en un dispositivo WAVE Biorreactor™ de 25 l, con un volumen de cultivo total de aproximadamente 15 l (o entre 14-16 l) y se incuba con un flujo de aire de 1,5 l/minuto.

Cuando la densidad celular en el dispositivo WAVE Biorreactor™ de 25 l alcanza aproximadamente $2,2 \times 10^6$ células/ml, se expande el cultivo en un dispositivo WAVE Biorreactor™ de 100 l, con un volumen de cultivo total de aproximadamente 80 l (o entre 75-85 l), usando medios CD-CHO AGT™ que se complementan con 3,6 g/l de metotrexato, 40 ml/l de GlutaMAX™-I y 1 ml/l de NaOH 1 N, y se incuba con un flujo de aire de 1,5 l/minuto. Cuando la densidad celular en el dispositivo WAVE Biorreactor™ de 100 l alcanza aproximadamente $2,6 \times 10^6$ células/ml, se expande el cultivo en un biorreactor de siembra de 600 l (ABEC, Inc. Bethlehem, PA; Stainless Technology division) con un volumen de cultivo total de aproximadamente 480 l (o entre 440-520 l) usando medios CD-CHO AGT™ que se complementan con 40 ml/l de GlutaMAX™-I, y se incuba hasta que la densidad celular en el biorreactor de 600 l alcanza aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células/ml.

2. Producción de rHuPH20

Se usa un biorreactor de 3500 l con un volumen total de 3523 l y un volumen de trabajo de 500-2500 l (ABEC, Inc., Bethlehem, PA) para la producción de alto rendimiento de rHuPH20. Tras la esterilización, se añaden al biorreactor aproximadamente 1800-2000 l de medios CD-CHO AGT™ que contienen 24,3 g/l de polvo de CD-CHO AGT™, complementado con 40 ml/l de GlutaMAX™-I y 5 mg/l de rHuInsulina. Parámetros se establecen en: punto de ajuste de temperatura, 37°C; velocidad del impulsor: 75 RPM; presión del recipiente: 5 psi; burbujeo de aire: 18 l/min; oxígeno disuelto: 25%; pH $\leq 7,2$. Antes de su uso, se comprueba el reactor para determinar la contaminación. Se inoculan aproximadamente entre 300-500 l de células (dependiendo del recuento celular) del cultivo de biorreactor de siembra de 600 l en el medio de cultivo celular en el biorreactor de 3500 l a una densidad de inoculación de $4,0 \times 10^5$ células viables por ml, para alcanzar un volumen total de 2100 l. Durante la incubación celular de 14 días, se toman muestras del biorreactor diariamente para determinar la viabilidad celular, la densidad celular, la verificación del pH y la actividad enzimática. También se monitorizan la temperatura y el oxígeno disuelto minuciosamente.

Se añaden alimentaciones de nutrientes durante la ejecución de 14 días en el biorreactor, cada una a aproximadamente el 4% v/v. El día 5, se añaden aproximadamente 84 l (o el 4% v/v) de medio #1 de alimentación (81 g/l de polvo de CD-CHO AGT™ + 33 g/l de glucosa + 13,3 ml/l de GlutaMAX™-I + 83,3 g/l de Yeastolate + 33 mg/l de rHuInsulina). El día 7, se añaden aproximadamente 87 l (o el 4% v/v) de alimentación #2 (40,5 g/l de polvo de CD-CHO AGT™ + 33 g/l de glucosa + 66,7 ml/l de GlutaMAX™-I + 166,7 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio) y se cambió la temperatura de cultivo a 36,5°C. El día 9, se añaden aproximadamente 91 l (o el 4% v/v) de alimentación #3 (20,3 g/l de polvo de CD-CHO AGT™ + 50 g/l de glucosa + 50 ml/l de GlutaMAX™-I + 250 g/l de Yeastolate + 1,8 g/l de butirato de sodio) y se cambia la temperatura de cultivo a 36°C. El día 11, se añaden aproximadamente 94 l (o el 4% v/v) de alimentación #4 (20,3 g/l de polvo de CD-CHO AGT™ + 33,3 g/l de glucosa + 33,3 ml/l de GlutaMAX™-I + 250 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio) y se cambia la temperatura de cultivo a 35,5°C. Se recoge el reactor a los 14 días, produciendo una recogida de 2400-2600 l (normalmente de aproximadamente 2500 l).

Se transfiere a presión el cultivo a través de un sistema de 20 módulos de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, conteniendo cada uno una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana de celulosa, después a través de un segundo sistema de filtración Millistak (Millipore) que contiene 10 módulos, cada uno con una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a $<0,1$ µm, seguido de una membrana de celulosa, y después a través de un filtro final de 0,22 µm en una bolsa flexible estéril de un solo uso con una capacidad de 350 l. Se complementa el

líquido de cultivo celular recogido con EDTA 10 mM y Tris 10 mM, pH 8,4, hasta un pH objetivo de 7,5. Se concentra el cultivo 10× con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) (Pall) usando filtros de poliéter sulfona (PES) de corte de peso molecular (MWCO) de 30 kDa para TFF Sartoslice de 18-21 m² (Sartorius), seguido de intercambio del tampón 10× con Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 en un filtro final de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 350 l.

Se somete a inactivación viral la recogida sometida a diafiltración concentrada. 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 recogida sometida a diafiltración concentrada a Triton X-100 al 1%, TNBP al 0,3% hasta 2 horas en recipientes de reacción de acero inoxidable de 500 l inmediatamente antes de la purificación en la columna Q.

B. Purificación de rHuPH20 del Gen2

Se prepara una columna de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia) (81 l de resina, H = 26 cm, D = 63 cm). Se equilibra la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. Tras la inactivación viral, se carga la recogida sometida a inactivación vital, sometida a diafiltración, concentrada de aproximadamente 250 l en la columna Q a una velocidad de flujo de 150 cm/h. Se lava 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 eluye la proteína con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 en un filtro final de 0,22 µm en una bolsa estéril. Se somete a prueba la muestra de eluato para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática. Se tomaron lecturas de absorbancia A₂₈₀ al principio y al final del intercambio.

A continuación se realiza una cromatografía de interacción hidrófoba en Phenyl Sepharose (Pharmacia). Se prepara una columna Phenyl Sepharose (PS) (176 l de resina, H = 35 cm, D = 80 cm). Se equilibra 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 complementa el eluato de proteína anterior 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 carga la proteína en la columna PS a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se añadió fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0 a 100 cm/h. Se hace pasar la fracción no retenida a través de un filtro final de 0,22 µm en una bolsa estéril. Se toman muestras de la fracción no retenida para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Después se prepara una columna de boronato de aminofenilo (ProMedics; 176 l de resina, H = 35 cm, D = 80 cm). Se equilibra la columna con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. Se carga la proteína purificada en PS en la columna de boronato de aminofenilo a una velocidad de flujo de 50 cm/h. Se aumentó la velocidad de flujo hasta 100 cm/h para la parte restante del procedimiento. En primer lugar se lavó la columna con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0, después con bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0 y después con bicina 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 9,0. Se eluye la proteína con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6,9 y se hace pasar a través de un filtro estéril en una bolsa estéril. Se somete a prueba la muestra eluida para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Se prepara la columna de hidroxiapatita (HAP) (BioRad; 116 l de resina, H = 23 cm, D = 80 cm). Se equilibra la columna con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. Se complementa la proteína purificada en boronato de aminofenilo hasta concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y CaCl₂ 0,1 mM y se carga en la columna de HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/h. En primer lugar se lava la columna con fosfato de potasio 5 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, después con fosfato de potasio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. Se eluye la proteína con fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 y se hace pasar a través de un filtro estéril de 0,22 µm en una bolsa estéril. Se somete a prueba la muestra eluida para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Después se hace pasar la proteína purificada en HAP a través de un filtro de eliminación de virus. En primer lugar se prepara el filtro Viosart esterilizado (Sartorius) lavando con 2 l de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0. Se bombea la proteína purificada en HAP mediante una bomba peristáltica a través del filtro de eliminación de virus de 20 nM. Después se hace pasar la proteína filtrada en fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 a través de un filtro final de 0,22 µm en una bolsa estéril. Se somete a prueba la muestra sometida a filtración viral para determinar la concentración de proteína, la actividad enzimática, el perfil de oligosacáridos, monosacáridos y ácido siálico (tal como se describe en los ejemplos 9 a 10 a continuación).

Después se concentró la proteína en el filtrado 8-12× usando tres casetes de PES Sartocon de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD, cada uno con un área de superficie de filtro de 0,7 m², para un área de superficie total de 2,1 m². 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. Después se realizó una diafiltración 10× en la proteína concentrada. Esto puede realizarse de dos maneras: 1) usando un tampón histidina 20 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5 y polisorbato 80 al 1%; o 2) usando un tampón histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5. La proteína a granel sometida a diafiltración concentrada tiene una concentración de aproximadamente 10 mg/ml. Tras el intercambio del tampón, se

hace pasar la proteína concentrada a través de un filtro de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l.

Después se dispensa de manera aséptica la proteína a granel filtrada estéril a 400 ml en frascos de PFA estériles de 1 l Nalgene. Después se ultracongelan los frascos en un baño de nitrógeno líquido y se almacenan a menos de -20°C para la proteína a granel que no contiene el polisorbato 80 y a menos de -70°C para la proteína a granel que contiene el polisorbato 80.

La tabla 29 expone algunas diferencias a modo de ejemplo entre la producción de rHuPH20 en un cultivo de biorreactor de 300 l y 2500 l.

Tabla 29. Diferencias a modo de ejemplo entre la producción de rHuPH20 en un cultivo de biorreactor de 300 l y 2500 l

Diferencia entre procedimientos	Cultivo celular de 300 l	Cultivo celular de 2500 l
Línea celular	2B2	2B2
Medios usados para expandir el inóculo celular	Contiene metotrexato 20 µM (9 mg/l)	Contiene metotrexato 20 µM (9 mg/l)
Expansión celular	Expandido a través de matraz de 125 ml, matraz de 250 ml, matraz de 1 l, matraz de 6 l y matraz de 36 l.	Expandido a través de matraz de 125 ml, matraz de 250 ml, matraz de 1 l, 2 matraces de agitación de 2 l, 6 matraces de agitación de 2 l, dispositivo WAVE Biorreactor™ de 25 l, dispositivo WAVE Biorreactor™ de 100 l y un biorreactor de siembra de tanque agitado de 600 l
Volumen de operación final en el biorreactor	Aproximadamente 300 l en un biorreactor de 400 l	Aproximadamente 2500 l en un biorreactor de 3500 l
Medios de cultivo en la inoculación del biorreactor	CD CHO con 5,0 mg/l de rHuInsulina, 40 ml/l de GlutaMAX™-I (8 mM)	CD CHO AGT™ con 5,0 mg/l de rHuInsulina, 40 ml/l de GlutaMAX™-I (8 mM)
Volumen de alimentación de medios	Escalado al 4% del volumen de cultivo celular del biorreactor, es decir, aproximadamente 10,4, 10,8, 11,2 y 11,7 l, dando como resultado un volumen de biorreactor objetivo de ~300 l.	Escalado al 4% del volumen de cultivo celular del biorreactor, es decir, aproximadamente 84, 87, 91 y 94 l, dando como resultado un volumen de biorreactor objetivo de ~2500 l.
Alimentación de medios	Medio #1 de alimentación: 4× CD CHO + 33 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 32 mM + 16,6 g/l de Yeastolate + 33 mg/l de rHuInsulina Alimentación #2: 2× CD CHO + 33 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 16 mM + 33,4 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio Alimentación #3: 1 × CD CHO + 50 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 10 mM + 50 g/l de Yeastolate + 1,80 g/l de butirato de sodio Alimentación #4: 1 × CD CHO + 33 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 6,7 mM + 50 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio	Medio #1 de alimentación: 81 g/l de polvo de CD-CHO AGT™ + 33 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 26,6 mM + 83,3 g/l de Yeastolate + 33 mg/l de rHuInsulina Alimentación #2: 40,5 g/l de polvo de CD-CHO AGT™ + 33 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 13,4 mM + 166,7 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio Alimentación #3: 20,3 g/l de polvo de CD-CHO AGT™ + 50 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 10 mM + 250 g/l de Yeastolate + 1,8 g/l de butirato de sodio Alimentación #4: 20,3 g/l de polvo de CD-CHO AGT™ + 33,3 g/l de glucosa + GlutaMAX™-I 6,7 mM + 250 g/l de Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio

Filtración de cultivo celular de biorreactor	<p>1ª etapa - 4 módulos en paralelo, cada 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 de una membrana de celulosa.</p> <p>2ª etapa - módulo único 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 de una membrana de celulosa.</p> <p>3ª etapa - filtro de poliéter sulfona de 0,22 μm</p> <p>Bolsa de almacenamiento de 300 l</p>	<p>1ª etapa - 20 módulos en paralelo, cada 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 de una membrana de celulosa.</p> <p>2ª etapa - 10 módulos 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 de una membrana de celulosa.</p> <p>3ª etapa - filtro de poliéter sulfona de 0,22 μm</p> <p>Bolsa de almacenamiento de 350 l</p>
Concentración e intercambio del tampón antes de la cromatografía	<p>Concentrado usando cuatro filtros de 30 K de MWCO para TFF Sartoslice de Sartorius</p> <p>Intercambio del tampón al concentrado 10× con Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM, pH 7,5</p> <p>Bolsa de almacenamiento estéril de 50 l</p>	<p>Concentrado con 2 TFF con filtro de 30 K de MWCO de poliéter sulfona en espiral de Millipore</p> <p>Intercambio del tampón al concentrado 6× con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0</p> <p>Bolsa de almacenamiento estéril de 20 l</p>
Columna de Q Sepharose	9 l de resina, H = 29 cm, D = 20 cm	81 l de resina, H = 26 cm, D = 63 cm
Columna de Phenyl Sepharose (PS)	19-21 l de resina, H = 29 cm, D = 30 cm	176 l de resina, H = 35 cm, D = 80 cm
Columna de boronato de aminofenilo	21 l de resina, H = 29 cm, D = 30 cm	176 l de resina, H = 35 cm, D = 80 cm
Columna de hidroxapatita (HAP)	13 l de resina, H = 20 cm, D = 30 cm	116 l de resina, H = 23 cm, D = 80 cm
Concentración de proteína	Única filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocoon Slice de 10 kD de MWCO	Tres casetes de PES Sartocoon de 10 kD de corte de peso molecular (MWCO)
	Intercambio del tampón 6× con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0	Diafiltración 10× con: 1) tampón histidina 20 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5 y polisorbato 80 al 1%; o 2) tampón histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,5.
Llenado de viales	<p>Volúmenes de llenado de 20 ml</p> <p>Almacenados a $\leq 20^\circ\text{C}$</p>	<p>Volúmenes de llenado de 400 ml</p> <p>Almacenados a $\leq 20^\circ\text{C}$ si la proteína no contiene polisorbato 80, o a $\leq 70^\circ\text{C}$ si la proteína contiene polisorbato 80</p>

Lista de secuencias

<110> Halozyme, Inc.

5

<120> PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA DE HIALURONIDASA SOLUBLE

<130> 225788

<150> Documento US 61/068.622

<151> 06-03-2008

<160> 71

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<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

```

ES 2 981 983 T3

```

      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>
 <223> PH20 madura

```

10 <400> 2
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1      5      10      15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
      20      25      30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
      35      40      45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
      50      55      60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65      70      75      80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
      85      90      95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
      100     105     110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
      115     120     125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130     135     140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145     150     155     160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
      165     170     175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
      180     185     190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile

```

```

      195              200              205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
 210              215              220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225              230              235              240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
      245              250              255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
      260              265              270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
      275              280              285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
      290              295              300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305              310              315              320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
      325              330              335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
      340              345              350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
      355              360              365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
      370              375              380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385              390              395              400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
      405              410              415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
      420              425              430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
      435              440              445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
      450              455              460
Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
465              470

```

<210> 3
 <211> 482
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> rHuPH20 soluble precursor

```

10 <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> 1-447 de rHuPH20 soluble

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

<210> 5

<211> 446

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 1-446 de rHuPH20 soluble

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													

 $\langle 210 \rangle$ 6 $\langle 211 \rangle$ 445

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

 $\langle 220 \rangle$

<223> 1-445 de rHuPH20 soluble

10

<400> 6

ES 2 981 983 T3

```

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

```

<210> 7

<211> 444

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 1-444 de rHuPH20 soluble

10

<400> 7

ES 2 981 983 T3

```

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

```

<210> 8

<211> 443

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 1-443 de rHuPH20 soluble

10

<400> 8

ES 2 981 983 T3

```

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

```

<210> 9

5 <211> 442

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> 1-442 de rHuPH20 soluble

<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

```

<210> 10
5 <211> 450
<212> PRT
<213> *Bos taurus*

<220>
10 <223> hialuronidasa

<400> 10

```

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

```

<210> 11
 5 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Vespula vulgaris*

<220>
 10 <223> hialuronidasa A

<400> 11

ES 2 981 983 T3

```

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> 12
 5 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Vespula vulgaris*

<220>
 10 <223> hialuronidasa B

<400> 12


```

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 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> 13
 <211> 382
 5 <212> PRT
 <213> *Apis mellifera*

<220>
 <223> hialuronidasa

10 <400> 13

```

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> 14

<211> 331

5 <212> PRT

<213> *Dolichovespula maculata*

<220>

<223> hialuronidasa

10

<400> 14

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

<210> 15
<211> 367
5 <212> PRT
<213> *Polistes annularis*

<220>
10 <223> hialuronidasa

<400> 15
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
				85					90				95	
Glu	Glu	Arg	Asn	Gly	Gly	Val	Pro	Gln	Arg	Gly	Asn	Ile	Thr	Ile
			100					105					110	His
Leu	Gln	Gln	Phe	Asn	Glu	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Thr	Pro	Asp	Lys
			115				120					125		Asn
Phe	Gly	Gly	Ile	Gly	Val	Ile	Asp	Phe	Glu	Arg	Trp	Lys	Pro	Ile
	130					135					140			Phe
Arg	Gln	Asn	Trp	Gly	Asn	Thr	Glu	Ile	His	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ile
145					150					155				160
Leu	Val	Arg	Lys	Glu	His	Pro	Lys	Trp	Ser	Glu	Ser	Met	Ile	Glu
				165					170					175
Glu	Ala	Thr	Lys	Lys	Phe	Glu	Lys	Tyr	Ala	Arg	Tyr	Phe	Met	Glu
			180					185					190	Glu
Thr	Leu	Lys	Leu	Ala	Lys	Lys	Thr	Arg	Lys	Arg	Ala	Lys	Trp	Gly
	195						200					205		Tyr
Tyr	Gly	Phe	Pro	Tyr	Cys	Tyr	Asn	Val	Thr	Pro	Asn	Asn	Pro	Gly
	210					215					220			Pro
Asp	Cys	Asp	Ala	Lys	Ala	Thr	Ile	Glu	Asn	Asp	Arg	Leu	Ser	Trp
225					230					235				Met
Tyr	Asn	Asn	Gln	Glu	Ile	Leu	Phe	Pro	Ser	Val	Tyr	Val	Arg	His
			245						250					255
Gln	Lys	Pro	Glu	Glu	Arg	Val	Tyr	Leu	Val	Gln	Gly	Arg	Ile	Lys
			260					265					270	Glu
Ala	Val	Arg	Ile	Ser	Asn	Asn	Leu	Glu	His	Ser	Pro	Ser	Val	Leu
	275						280					285		Ala
Tyr	Trp	Trp	Tyr	Val	Tyr	Gln	Asp	Lys	Met	Asp	Ile	Tyr	Leu	Ser
	290					295				300				Glu
Thr	Asp	Val	Glu	Lys	Thr	Phe	Gln	Glu	Ile	Val	Thr	Asn	Gly	Gly
305					310				315					320
Gly	Ile	Ile	Ile	Trp	Gly	Ser	Ser	Ser	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Ser
			325						330					Lys
Cys	Lys	Arg	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Leu	Asn	Thr	Leu	Gly	Pro	Phe
			340				345					350		Ala
Val	Asn	Val	Thr	Glu	Thr	Val	Asn	Gly	Arg	Ser	Ser	Leu	Asn	Phe
		355					360					365		

<210> 16
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 16

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

```

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

```

<210> 17

<211> 473

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> Hialuronidasa 2

10

<400> 17

```

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> 18

<211> 412

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> hialuronidasa 3

10

<400> 18

Met Ile Met His Leu Gly Leu Met Met Val Val Gly Leu Thr Leu Cys

ES 2 981 983 T3

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> 19

<211> 435

5 <212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<220>

<223> hialuronidasa

10

<400> 19

Met Ala Ala His Leu Leu Pro Ile Cys Thr Leu Phe Leu Asn Leu Leu

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

<210> 20
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

<220>
 <223> hialuronidasa 3

<400> 20

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> 21

<211> 449

5 <212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<223> hialuronidasa 1

10

<400> 21

ES 2 981 983 T3

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

Met

<210> 22

<211> 473

5 <212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<223> hialuronidasa 2

10

<400> 22

```

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

```

<210> 23
 5 <211> 412
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<220>
 10 <223> hialuronidasa 3

<400> 23

```

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 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> 24

5 <211> 545

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<220>

10 <223> PH20

<400> 24

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Gly Ser Ala Val Glu
 1      5      10      15
Leu Ser Gly Val Phe Gln Ile Val Phe Ile Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20      25      30
Cys Leu Thr Ala Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35      40      45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Thr Glu Phe Cys Leu Gly Lys Ser
 50      55      60
Gly Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Leu Phe Gly Ser Pro Arg
 65      70      75      80
Lys Asn Lys Thr Gly Gln Gly Ile Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85      90      95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Pro His Thr Gly Ala Ile Val His Gly
100      105      110
Arg Ile Pro Gln Leu Gly Pro Leu Gln Gln His Leu Thr Lys Leu Arg
115      120      125
Gln Glu Ile Leu Tyr Tyr Met Pro Lys Asp Asn Val Gly Leu Ala Val
130      135      140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Leu Pro Thr Trp Leu Arg Asn Trp Lys Pro
145      150      155      160
Lys Asp Ile Tyr Arg Ile Lys Ser Ile Glu Leu Val Lys Ser Gln His
165      170      175
Pro Gln Tyr Asn His Ser Tyr Ala Thr Glu Lys Ala Lys Arg Asp Phe
180      185      190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Gly Arg
195      200      205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210      215      220
Tyr Asn His His Tyr Asp Lys Pro Asn Leu Tyr Lys Gly Ser Cys Phe
225      230      235      240
Asp Ile Glu Lys Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Lys Glu
245      250      255
Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Ala Arg Ser
260      265      270
Ala Thr Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Val Val Arg Asn Arg Val His Glu
275      280      285
Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile Pro Asp Asp Lys Ser Pro Leu Pro Asn
290      295      300
Phe Val Tyr Thr Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Ile Phe Gln Phe Leu
305      310      315      320
Ser His His Asp Leu Val Tyr Thr Ile Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly
325      330      335
Ala Ser Gly Ile Val Val Trp Gly Ser Gln Ser Leu Ala Arg Ser Met
340      345      350
Lys Ser Cys Leu His Leu Asp Asn Tyr Met Lys Thr Ile Leu Asn Pro
355      360      365
Tyr Leu Ile Asn Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Asn Gln Val Leu
370      375      380
Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys Thr Arg Lys Asn Trp Asn Pro Asn Asp
385      390      395      400
Tyr Leu His Leu Asn Pro Gly Asn Phe Ala Ile Gln Leu Gly Ser Asn
405      410      415
Gly Thr Tyr Lys Val Asp Gly Lys Pro Thr Leu Thr Asp Leu Glu Gln
420      425      430
Phe Ser Lys Asn Phe Gln Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Asn Cys Lys
435      440      445
Glu Arg Thr Asp Met Asn Asn Val Arg Thr Val Asn Val Cys Ala Val
450      455      460
Glu Asn Val Cys Ile Asp Thr Asn Val Gly Pro Gln Ala Val Thr Tyr
465      470      475      480
Ala Pro Lys Glu Lys Lys Asp Val Ala His Ile Leu Ser Asn Thr Thr
485      490      495
Ser Ile Asn Ser Ser Thr Thr Met Ser Leu Pro Phe Pro Arg Lys His
500      505      510
Val Ser Gly Cys Leu Leu Val Leu Cys Met Tyr Ser Gln Tyr Leu Asn
515      520      525
Ile Cys Tyr Arg Leu Val Ala Ile Gly Ile Gln His Gly Tyr Tyr Leu
530      535      540
Lys
545

```

<211> 476
<212> PRT
<213> *Ovis aries*

5 <220>
<223> hialuronidasa 2

<400> 25

```

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

```

10

<210> 26
<211> 414

<212> PRT
 <213> *Pongo pygmaeus*

<220>
 <223> hialuronidasa 3

<400> 26
 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> 27
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

<220>
 <223> PH20

<400> 27

```

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

```

<210> 28

<211> 529

<212> PRT

<213> *Cavia porcellus*

<220>

<223> PH20

<400> 28

```

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 Asn Gly Lys Phe Val
405      410      415
Val His Gly Lys Pro Ser Leu Glu Asp Leu Gln Glu Phe Ser Lys Asn
420      425      430
Phe His Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Val Ala Cys Lys Asp Arg Leu Asp
435      440      445
Val His Asn Val Arg Ser Val Asn Val Cys Thr Ala Asn Asn Ile Cys
450      455      460
Ile Asp Ala Val Leu Asn Phe Pro Ser Leu Asp Asp Asp Asp Glu Pro
465      470      475      480
Pro Ile Thr Asp Asp Thr Ser Gln Asn Gln Asp Ser Ile Ser Asp Ile
485      490      495
Thr Ser Ser Ala Pro Pro Ser Ser His Ile Leu Pro Lys Asp Leu Ser
500      505      510
Trp Cys Leu Phe Leu Leu Ser Ile Phe Ser Gln His Trp Lys Tyr Leu
515      520      525
Leu

```

5

<210> 29

<211> 512
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5 <220>
 <223> PH20

<400> 29
 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				
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> 30

<211> 512

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

 $\langle 220 \rangle$

<223> PH20

10

<400> 30

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> 31

<211> 807

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 31

```

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> 32

<211> 371
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogenes*, bacteriófago H4489A

5 <220>
 <223> hialuronidasa

<400> 32
 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> 33
 <211> 1628
 <212> PRT
 15 <213> *Clostridium perfringens*

<220>
 <223> hialuronidasa

20 <400> 33

ES 2 981 983 T3

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 Asp Gly Val Glu						
	1140		1145		1150	
Asn Gly Val Asp Asp Met Phe Ser Thr Pro Leu Lys Asn Gly Tyr Lys						
	1155		1160		1165	
His Gly Asn Gln Ser Gly Gly Ile Val Pro Ile Asp Ser Ala Tyr Val						
	1170		1175		1180	
Glu Gly Asp Asn Leu Asn Gln Lys Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Phe						
	1185		1190		1195	1200
Thr Ala Pro Tyr Arg His Arg Trp Thr Val Ile Asn Glu Leu Met Ile						
	1205		1210		1215	
Asn Asn Gly Glu Tyr Ile Ser Thr Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ile Ser						
	1220		1225		1230	
Asn Pro Ile Glu Glu Arg Gly Phe Ala Pro Ser Asn Leu Arg Asp Gly						
	1235		1240		1245	
Asn Leu Thr Thr Ser Tyr Lys Pro Asn Thr Asn Asn Gly Glu Ile Ser						
	1250		1255		1260	
Glu Gly Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Lys Thr Asp Val Arg Lys						
	1265		1270		1275	1280
Val Thr Ile Val Gln Ser Gly Ser Ser Ile Ser Asn Ala Lys Val Met						
	1285		1290		1295	
Ala Arg Val Gly Asp Gly Ser Glu Asn Val Thr Asp Gln Trp Val Gln						
	1300		1305		1310	
Leu Gly Thr Leu Ser Asn Ser Leu Asn Glu Phe Ile Asn Arg Asp Tyr						
	1315		1320		1325	
Asn Asn Ile Tyr Glu Ile Lys Ile Glu Trp Thr Asp Val Ala Pro Asn						
	1330		1335		1340	
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> 34

<211> 435

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Hialuronidasa-1 [Precursor]

10

<400> 34

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 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> 35
 <211> 473
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 10 <223> Hialuronidasa-2 [Precursor]

<400> 35
 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> 36

<211> 417

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Hialuronidasa-3 [Precursor]

10

<400> 36

```

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

<210> 37
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Hialuronidasa-4

<400> 37
 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

ES 2 981 983 T3

```

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> 38

<211> 467

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 1-467 de precursor de sHuPH20

10

<400> 38

```

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> 39
 5 <211> 477
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 10 <223> 1-477 de precursor de sHuPH20

<400> 39

ES 2 981 983 T3

```

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

```

<210> 40

5 <211> 478

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> 1-478 de precursor de sHuPH20

<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 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 465     470     475

```

<210> 41

5 <211> 479

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> 1-479 de precursor de sHuPH20

<400> 41

ES 2 981 983 T3

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1      5      10      15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20      25      30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35      40      45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50      55      60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65      70      75      80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85      90      95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100      105      110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115      120      125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130      135      140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145      150      155      160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165      170      175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180      185      190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195      200      205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210      215      220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225      230      235      240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245      250      255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260      265      270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275      280      285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290      295      300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305      310      315      320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325      330      335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340      345      350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355      360      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370      375      380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
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> 42

5 <211> 480

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> 1-480 de precursor de sHuPH20

<400> 42

```

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

```

<210> 43

5 <211> 481

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> 1-481 de precursor de sHuPH20

<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 Ile
465      470      475      480
Phe

```

<210> 44

5 <211> 483

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> 1-483 de precursor de sHuPH20

<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
Phe Tyr Asn

```

<210> 45

5 <211> 432

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> 36-467 de sHuPH20 madura

<400> 45

ES 2 981 983 T3

```

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

```

<210> 46
 <211> 448
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> 36-483 de sHuPH20 madura

10 <400> 46

```

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> 47

5 <211> 1446

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> ADN que codifica para "precursor" de rHuPH20 soluble

<400> 47

```

atgggagtg c taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaattc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
cttggaatat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccoga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatcct 660
tttccggatt gttacaacca tcaactataag aaaccgggtt acaatggaaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaatga tgatctcagc tgggttgagg atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggt 900
tttgcatata ccgcgatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catgttgcca aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctacagacca aaatgtgtag ccaagtgtt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac 1446

```

<210> 48

<211> 509

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> variante P48A de PH20

10

<400> 48

```

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
					295					300					
Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu
305					310					315					320
Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile
				325					330					335	
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu
			340					345					350		
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn
		355				360						365			
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln
					375						380				
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</												

<210> 49
<211> 509
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> variante L499W de PH20 precursora
<400> 49

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1      5      10      15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20      25      30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35      40      45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50      55      60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65      70      75      80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85      90      95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100      105      110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115      120      125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130      135      140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145      150      155      160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165      170      175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180      185      190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195      200      205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210      215      220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225      230      235      240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245      250      255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260      265      270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275      280      285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290      295      300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305      310      315      320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325      330      335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340      345      350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355      360      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370      375      380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385      390      395      400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405      410      415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420      425      430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435      440      445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450      455      460
Ile Asp Ala 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> 50
 <211> 6630
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> vector HZ24

<400> 50

tcaatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta	60
ttggccattg	catagcttgt	atctatatca	taatatgtac	atztatattg	gctcatgtcc	120
aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gactagttat	taatagtaat	caattacggg	180
gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	240
gcctggctga	ccgcccacg	acccccgcc	attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	300
agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtattttac	ggtaaactgc	360
ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcatat	gccaaagtccg	ccccctattg	acgtcaatga	420
cggtaaatgg	cccgcctggc	attatgcccc	gtacatgacc	ttacgggact	ttcctacttg	480
gcagtacatc	tacgtattag	tcattcgctat	taccatgggtg	atgcggtttt	ggcagtacac	540
caatggcggt	ggatgacggg	ttgactcacg	gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	600
caatgggagt	ttgttttggc	acccaaatca	acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaataaacc	660
cgccccgttg	acgcaaattg	gcggtaggcg	tgtacgggtg	gaggtctata	taagcagagc	720
tcgtttagt	aaccgtcaga	tactagaag	ctttattg	gtagtttatc	acagttaaat	780
tgctaacgca	gtcagtgctt	ctgacacaac	agtctcgaac	ttaagctgca	gaagttgggc	840
gtgaggcact	gggcaggtaa	gtatcaagg	tacaagacag	gtttaaggag	accaatagaa	900
actgggcttg	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	taggcaccta	ttggtcttac	960
tgacatccac	tttgcccttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	acagctctta	1020
aggctagagt	acttaatac	actcactata	ggtagcatg	ggagtgttaa	aattcaagca	1080
catctttttc	agaagctttg	ttaaatcaag	tggagtatcc	cagatagt	tcaccttctc	1140
tctgattcca	tgttgcttga	ctctgaattt	cagagcacct	cctgttattc	caaagtgtgc	1200
tttcctctgg	gcctggaatg	ccccaaagtga	attttgtctt	ggaaaatttg	atgagccact	1260
agatatgagc	ctcttctctt	tcataggaag	ccccgaata	aacgccaccg	ggcaagggtg	1320
tacaatattt	tatgttgata	gacttggcta	ctatccttac	atagattcaa	tcacaggagt	1380
aactgtgaat	ggaggaatcc	cccagaagat	ttcctttacaa	gaccatctgg	acaaagctaa	1440
gaaagacatt	acattttata	tgccagtaga	caatttggga	atggctgtta	ttgactggga	1500
agaatggaga	ccacttggg	caagaaactg	gaaaccta	gatgtttaca	agaatagggtc	1560
tattgaattg	gttcagcaac	aaaatgtaca	acttagtctc	acagaggcca	ctgagaaagc	1620
aaaacaagaa	ttgaaaagg	cagggaagga	tttcctggta	gagactataa	aattgggaaa	1680
attactctgg	ccaaatcact	tgtggggtta	ttatcttttt	ccggattgtt	acaacccatca	1740
ctataagaaa	cccggttaca	atggaagtgt	cttcaatgta	gaaataaaaa	gaaatgatga	1800
tctcagctgg	ttgtggaatg	aaagcactgc	tctttaccca	tccattttatt	tgaacactca	1860
gcagtctcct	gtagctgcta	cactctatgt	gcgcaatcga	gttcgggaag	ccatcagagt	1920
ttccaaaata	cctgatgcaa	aaagtccact	tcoggttttt	gcataataccc	gcatagtttt	1980
tactgatcaa	gttttgaaat	tcctttctca	agatgaactt	gtgtatacat	ttggcgaaac	2040
tgttgctctg	ggtgcttctg	gaattgtaat	atggggaacc	ctcagtataa	tgcgaaagtat	2100
gaaatcttgc	ttgtctcctag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
cgtcacacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgttttgc	caggagcaag	gagtgtgtat	2220
aaggaaaaac	tggaaattcaa	gtgactatct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgctattca	2280
acttgagaaa	ggtggaaagt	tcacagtagc	tggaaaaccg	acacttgaag	acctggagca	2340
attttctgaa	aaattttatt	gcagctgtta	tagcaccttg	agttgttaagg	agaaagctga	2400
tgtaaaagac	actgatgctg	ttgatgtgtg	tattgctgat	ggtgtctgta	tagatgcttt	2460
tctaaaacct	cccatggaga	cagaagaacc	tcaaattttc	tactgaggat	ccatagctaa	2520
cgccctctc	cctccccccc	ccctaacgtt	actggccgaa	gccgcttggg	ataaggccgg	2580
tgtgcgtttg	tctatatgtt	attttccacc	atattgccgt	cttttggcaa	tgtgagggcc	2640
cggaaacctg	gcctgtctt	cttgacgagc	attcctaggg	gtctttcccc	tctcgccaaa	2700
ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ttcttgaaga	2760
caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcgggaacc	ccccacctgg	cgacaggtgc	2820
ctctgcggcc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggcggcaca	acccagtg	2880
cacgttgtga	gttgatag	tgtggaaaga	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgtattcaac	2940
aaggggctga	aggatgcccc	gaaggtaacc	cattgtatgg	gatctgatct	ggggcctcgg	3000

tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac 3060
 ggggacgtgg ttttcccttg aaaaaaacga tgataagctt gccacaaccc acagcgcccg 3120
 ctgccatcat ggttcgacca ttgaactgca tcgtcgccgt gtcccaaaat atggggattg 3180
 gcaagaacgg agacctaccc tggcctccgc tcaggaacga gttcaagtac ttccaaagaa 3240
 tgaccacaac ctcttcagtg gaaggtaaac agaactctgt gattatgggt aggaaaacct 3300
 ggttctccat tcctgagaag aatcgacctt taaaggacag aattaatata gttctcagta 3360
 gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc caaaagtgtg gatgatgcct 3420
 taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gttaaagtaga catgggtttg atagtccggag 3480
 gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca cctcagactc tttgtgacaa 3540
 ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttcccaga aattgatttg gggaaatata 3600
 aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgagggtcca ggaggaaaaa ggcacaaagt 3660
 ataagtttga agtctacgag aagaagact aaacgcgtgg tacctctaga gtcgaccogg 3720
 gcggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 3780
 aatgcagtgca aaaaaatgct ttatttctga aatttctgat gctattgctt tatttctaac 3840
 cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 3900
 tcagggggag atgtggggag ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat 3960
 cgataaggat ccgggctggc gtaatagcga agaggcccgcc accgatcgcc cttcccaaca 4020
 gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgcattaaag cgcggcggtg 4080
 gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 4140
 gctttcttcc ctctctttct cgccacgttc gccggcttcc ccggtcaagc tctaaatcgg 4200
 gggctccctt taggggtccg attttagtgc ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4260
 taggggtgat gttcacgtag tgggcatcg ccctgataga cgggttttctg ccctttgacg 4320
 ttggagtgca cgttctttta tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaaac actcaacct 4380
 atctcggctc attcttttga tttataaggg attttgcoga tttcggccta ttggttaaaa 4440
 aatgagctga ttttaacaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
 tcctgatgcg gtattttctc cttacgcac agttaagcca gcccgacac cgcaccaacac 4560
 ctctcagtag aatctgctct gatgcgcac tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 4620
 ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc ccccgacac cgcttacaga caagctgtga 4680
 ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac 4740
 gaaagggcct cgtgatagcg ctatttttat aggttaatgt catgataata atgggttctt 4800
 agacgtcagg ttgcactttt cggggaaatg tgccgcgaac ccctatttgt ttatttttct 4860
 aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920
 attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttattt cccttttttg 4980
 cggcattttg ccttcctgtt tttgtctacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
 aagatcagtt ggggtgcaga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
 ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat 5160
 gtggcgcggt attatcccggt attgacgcgg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 5220
 attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
 tgacagtaag agaattatgc agtgcgtcca taaccatgag tgataaacact gcggccaact 5340
 tactttctgac aacgactcga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg 5400
 atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 5460
 agcgtgacac cagcatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaaacta ttaactggcg 5520
 aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagtgt 5580
 caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 5640
 ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5700
 gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5760
 tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc atttgtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
 atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
 tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5940
 accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 6000
 gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggttg tttgcgggat caagagctac 6060
 caactctttt tccgaaggta actggttcca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
 tagtgtagcc ctggtttagc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
 ctctgctaatt cctgattacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt 6240
 tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 6300
 gcacacagcc cagcttgagg cgaacgacct acaccgaaact gagataccta cagcgtgagc 6360
 tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 6420
 gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
 gtcctgctcg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
 ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctcg gccttttgct 6600
 ggccttttgc teacatggct cgacagatct 6630

<210> 51
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <223> dihidrofolato reductasa

<400> 51

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

- 5 <210> 52
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> cebador directo HZM3.P1
- 23 <400> 52
tttgaacct cagcagtctc ctg
- 15 <210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> cebador inverso HZM3.P2
- 20 <400> 53
aactctgatg gcttcccgaa
- 25 <210> 54
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> sonda HZM3
- 28 <400> 54
agctgtctaca ctctatgtgc gcaatcga
- 35 <210> 55
<211> 1449
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
- 40 <220>
<223> secuencia de ARNm de PH20 de células 3D35M
- <400> 55

```

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

```

<210> 56

<211> 17

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AP01

10

<400> 56

ttctctccac aggtgtc

17

<210> 57

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> AP02

<400> 57

aagatttct tacaagac

18

25 <210> 58

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> AP03

<400> 58

tgccgagagg ggaaagac

18

35

<210> 59

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> AP04

<400> 59

ES 2 981 983 T3

	ccatttattt gaacactc	18
5	<210> 60 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> AP06 <400> 60 ccgaactcga ttgcgcac	18
15	<210> 61 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> AP07 <400> 61 agccattccc aaattgtc	18
25	<210> 62 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> AP08 <400> 62 ctcccagttc aattacag	18
35	<210> 63 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> AP09 <400> 63 cgttagctat ggatcctc	18
45	<210> 64 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> AP10 <400> 64 cgagacagag aagactcttg cg	22
55	<210> 65 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> AP12 <400> 65	

cattcaacag accttgcat cc 22

<210> 66
<211> 17
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> péptido C-terminal escindido a partir de los aa 431-447 de rHuPH20 soluble

10 <400> 66
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
1 5 10 15
Tyr

<210> 67
15 <211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
20 <223> péptido C-terminal escindido a partir de los aa 431-446 de rHuPH20 soluble

<400> 67
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
1 5 10 15

25 <210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<223> péptido C-terminal escindido a partir de los aa 431-445 de rHuPH20 soluble

<400> 68
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
1 5 10 15

35 <210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <220>
<223> péptido C-terminal escindido a partir de los aa 431-444 de rHuPH20 soluble

<400> 69
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
1 5 10

45 <210> 70
<211> 13
<212> PRT
50 <213> *Homo sapiens*

<220>
<223> péptido C-terminal escindido a partir de los aa 431-443 de rHuPH20 soluble

55 <400> 70
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
1 5 10

<210> 71
60 <211> 12
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> péptido C-terminal escindido a partir de los aa 431-442 de rHuPH20 soluble

5

<400> 71

Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu
1				5					10		

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una mezcla de polipéptidos, comprendiendo dicha mezcla los polipéptidos expuestos en las SEQ ID NO:4-8, en la que la composición puede obtenerse mediante el siguiente método:
 - a) inocular medio celular en un biorreactor con un inóculo de células que codifican para PH20 humana recombinante (rHuPH20) soluble para producir un cultivo celular, en el que:
 - las células comprenden entre 150 y 300 copias de ácido nucleico que codifica para rHuPH20 soluble;
 - el biorreactor contiene al menos 100 litros de cultivo celular;
 - se inoculan 10^{10} - 10^{11} células por 100 litros de cultivo celular; y
 - las células se cultivan a una temperatura establecida;
 - b) alimentar las células con un primer medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, insulina humana y extracto de levadura en cantidades suficientes para aumentar el crecimiento celular y la densidad celular máxima y para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble, en el que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 0,5% al 20% del volumen de cultivo celular;
 - c) alimentar las células con un segundo medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble e inducir la detención del ciclo celular; y
 - reducir la temperatura en comparación con la temperatura en la etapa a) hasta una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en el que:
 - la cantidad de L-alanil-L-glutamina se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina en la etapa b);
 - la cantidad de extracto de levadura se aumenta en comparación con la cantidad de extracto de levadura en la etapa b); y
 - el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 0,5% al 20% del volumen de cultivo celular;
 - d) alimentar las células con un tercer medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble y aumentar la detención del ciclo celular; y
 - reducir la temperatura en comparación con la temperatura en la etapa c) hasta una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en el que:
 - la cantidad de L-alanil-L-glutamina se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina en la etapa c);
 - las cantidades de extracto de levadura, glucosa y butirato de sodio se aumentan en comparación con las cantidades de extracto de levadura, glucosa y butirato de sodio en la etapa c); y
 - el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 0,5% al 20% del volumen de cultivo celular;
 - e) alimentar las células con un cuarto medio de alimentación que contiene glucosa, L-alanil-L-glutamina, extracto de levadura y butirato de sodio en cantidades suficientes para aumentar la síntesis de rHuPH20 soluble y aumentar la detención del ciclo celular; y
 - reducir la temperatura en comparación con la temperatura en la etapa d) hasta una temperatura suficiente para aumentar la detención del ciclo celular, aumentar la viabilidad celular y estabilizar la hialuronidasa soluble; en el que:
 - la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa se reduce en comparación con la cantidad de L-alanil-L-glutamina y glucosa en la etapa d);
 - la cantidad de butirato de sodio se reduce en comparación con la cantidad de butirato de sodio en la etapa d); y

el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 0,5% al 20% del volumen de cultivo celular;

f) continuar cultivando las células hasta que la viabilidad disminuye por debajo de al menos el 50%;

g) obtener el líquido de cultivo celular de recogida; y

h) purificar la rHuPH20 a partir del líquido de cultivo celular de recogida,

en la que la rHuPH20 soluble es una forma soluble de PH20 humana que se expresa de manera recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO).

2. Composición según la reivindicación 1, en la que la temperatura en la etapa a) es de 37°C.

3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que la temperatura en la etapa c) es de 36,5°C.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la temperatura en la etapa d) es de 36°C.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la temperatura en la etapa e) es de 35,5°C.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el líquido de cultivo celular de recogida se filtra antes de la purificación.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la purificación de rHuPH20 soluble se efectúa mediante cromatografía en columna.

8. Composición según la reivindicación 7, en la que la cromatografía en columna comprende cromatografía en columna de agarosa reticulada con perlas, cromatografía en columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas, cromatografía en columna de boronato de aminofenilo y cromatografía en columna de hidroxipatita.

9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen del cultivo celular.

10. Composición según la reivindicación 1, en la que:

en la etapa a) las células se cultivan a 37°C;

en la etapa b) el primer medio de alimentación contiene 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 32 mM, 16,6 g/l de extracto de levadura y 33 mg/l de insulina, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular;

en la etapa c) el segundo medio de alimentación contiene 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 16 mM, 33,4 g/l de extracto de levadura y 0,92 g/l de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce hasta 36,5°C;

en la etapa d) el tercer medio de alimentación contiene 50 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 10 mM, 50 g/l de extracto de levadura y 1,8 g/l de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce hasta 36°C;

en la etapa e) el cuarto medio de alimentación contiene 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 6,6 mM, 50 g/l de extracto de levadura y 0,92 g/l de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular; y

la temperatura se reduce hasta 35,5°C; que comprende además filtrar el líquido de cultivo celular de recogida obtenido en la etapa g) y

en la etapa h) purificar la rHuPH20 a partir del líquido de cultivo de recogida usando cromatografía en columna de agarosa reticulada con perlas, cromatografía en columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas, cromatografía en columna de boronato de aminofenilo y cromatografía en columna de hidroxipatita.

11. Composición según la reivindicación 1, en la que:
5 en la etapa a) las células se inoculan a una densidad celular de 4×10^5 células/ml; y
las células se cultivan a 37°C;
10 en la etapa b) el primer medio de alimentación contiene 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 32 mM, 83,3 g/l de extracto de levadura y 33 mg/l de insulina, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular;
15 en la etapa c) el segundo medio de alimentación contiene 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 13 mM, 166,7 g/l de extracto de levadura y 0,92 g/l de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular; y
la temperatura se reduce hasta 36,5°C;
20 en la etapa d) el tercer medio de alimentación contiene 50 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 10 mM, 250 g/l de extracto de levadura y 1,8 g/l de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular; y
la temperatura se reduce hasta 36°C;
25 en la etapa e) el cuarto medio de alimentación contiene 33 g/l de glucosa, L-alanil-L-glutamina 6,7 mM, 250 g/l de extracto de levadura y 0,92 g/l de butirato de sodio, y el medio de alimentación se añade al cultivo a un volumen del 4% del volumen de cultivo celular; y
la temperatura se reduce hasta 35,5°C; que comprende además
30 filtrar el líquido de cultivo celular de recogida obtenido en la etapa g) y
en la etapa h) purificar la rHuPH20 a partir del líquido de cultivo de recogida usando cromatografía en columna de agarosa reticulada con perlas, cromatografía en columna de agarosa sustituida con fenilo reticulada con perlas, cromatografía en columna de boronato de aminofenilo y cromatografía en columna de hidroxipatita.
35 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que se producen al menos 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ó 40 gramos de rHuPH20 soluble por 100 l de cultivo celular.
40 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la actividad específica de la rHuPH20 soluble es de al menos 80000, 100000, 120000, 140000, 160000 ó 180.000 unidades/mg.
14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el volumen de cultivo celular en el biorreactor es de 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 ó 3500 litros.
45 15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que las células que codifican para rHuPH20 soluble son células CHO DG44.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que la rHuPH20 está codificada por el ácido nucleico expuesto en SEQ ID NO:47.