ÖZET

BİR HİYALÜRONAN AYRIŞTIRICI ENZİM VE BİR BAĞIŞIKLIK KONTROL NOKTASI İNHİBİTÖRÜYLE KOMBİNASYON TERAPİSİ

Bir hiyalüronidaz gibi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün kombinasyonları sunulmaktadır. Kombinasyonlar bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerini veya tümörler üzerindeki immünosüpresif etkilerin başka inhibitörlerini içeren herhangi bir terapiyi, özellikle tümöre karşı terapiyi geliştirmek için kullanılır. Kombinasyon terapisi katı ve katı olmayan tümörler de dâhil olmak üzere kanserlerin tedavisinde kullanım içindir. Kanserleri tedavi etmenin usulleri de sunulmaktadır.

İSTEMLER

1. Aşağıdakileri içeren bir kombinasyon:

bir hiyalüronidaz içeren bir ilk bileşim, burada hiyalüronidaz bir polimere konjuge edilir veya yavaş salım için formüle edilir veya bir tümöre tatbik için bir vektör içinde kodlanır; ve

bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü içeren ikinci bir bileşim, burada bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir anti-CTLA4, anti-PD-1 veya anti-PD-Ll antikoru veya bunun antijen bağlayıcı fragmanıdır.

2. Bir hayvanda kanser tedavisinde kullanım için istem 1'in kombinasyonu olup, burada hayvan ilk olarak hiyalüronidaza maruz bırakılır ve sonra bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle temas ettirilir.

3. Bir hastada bir kanserin tedavisinde kullanım için bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada:

hasta bir hiyalüronidazla tedavi edilir;

hiyalüronidaz bir polimere konjuge edilir veya sürekli salım için formüle edilir, burada bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir anti-CTL4, anti-PD-1 veya anti-PD-L1 antikoru veya bunun antijen bağlayıcı fragmanıdır.

4. İstem 1'in kombinasyonu, istem 2'ye uygun kullanım için kombinasyon veya istem 3'e uygun kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada hiyalüronidaz bir PH20 veya bir C terminal glikosilfosfatidilinozitol (GPI) bağlanma yerinden veya GPI bağlanma yerinin bir bölümünden ari olan bunun budanmış formudur, burada PH20 çözünebilir.

5. İstem 4'ün kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada:

hiyalüronidaz aşağıdakiler arasından seçilen C terminal olarak budanmış bir PH20'dir:

a) DİZİ İD NO: 217'nin 36-464. amino asitlerini ve bir C terminal amino asit kalıntısına kadar kalıntıları içeren, DİZİ İD NO: 217'nin bitişik bir amino asit dizisi, burada polipeptit, dizisi DİZİ İD NO: 217'nin 1-509. veya 36-509. amino asitleri olarak verilen polipeptidin tam uzunluğunu içermeyeceği şekilde C terminal olarak budanır; ve

b) a)'nın amino asit dizisine en az %85 dizi özdeşliğine sahip, çözünür olan ve hiyalüronidaz aktivitesini koruyan bir amino asit dizisi.

6. İstem 4'ün kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada PH20 DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen bir amino asit dizisini veya DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen bir amino asit dizisine en az %85 dizi özdeşliği gösteren ve hiyalüronidaz aktivitesini koruyan bir amino asit dizisini içerir.

7. İstem 1-6'nın kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada polimer bir polialkilen glikol, dekstran, pullulan veya selülozdur.

8. İstem 7'nin kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada polialkilen glikol polietilen glikol (PEG) veya metoksipolietilen glikol (mPEG) arasından seçilir.

9. İstem 1-8'in kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada

hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bileşimi 0.1 μg/mL ila 100 μg/mL, 1 μg/mL ila 50 μg/mL veya 1 μg/mL ila 20 μg/mL aralığında. bir polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim içerir; veya

hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bileşimi 10 U/mL ila 5000 U/mL, 50 U/mL ila 4000 U/mL, 100 U/mL ila 2000 U/mL, 300 U/mL ila 2000 U/mL, 600 U/mL ila 2000 U/mL veya 100 U/mL ila 1000 U/mL aralığında, bir polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim içerir.

10. İstem 1-9'un kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir antijen bağlayıcı fragmandır.

11. İstem 1-10'un kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir anti-PD-L1 antikoru veya bunun antijen bağlayıcı fragmanıdır.

12. İstem 1-10'un kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada bağışıklık sistemi kontrol noktası

proteinine karşı antikor bir anti-CTLA4 antikoru, bunun türevi veya bunun antijen bağlayıcı fragmanı olup aşağıdakiler arasından seçilir:

a) aşağıdakileri içeren İpilimumab, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı:

DİZİ İD NO: 22'de verilen amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken sahası ve DİZİ İD NO: 24'te verilen amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken sahası; veya

DİZİ İD NO: 22'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 24'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken hafif zincir; ve

b) aşağıdakileri içeren Tremelimumab, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı:

DİZİ İD NO: 34'te verilen amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken sahası ve DİZİ İD NO: 36'da verilen amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken sahası; ve

DİZİ İD NO: 34'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 36'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken hafif zincir.

13. İstem 1-9'un kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor bir anti-PD-1 antikoru, bunun türevi veya bunun antijen bağlayıcı fragmanı olup aşağıdakiler arasından seçilir:

a) aşağıdakileri içeren Nivolumab, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı:

DİZİ İD NO: 54'te verilen amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken sahası ve DİZİ İD NO: 56'da verilen amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken sahası; veya

DİZİ İD NO: 54'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 56'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken hafif zincir;

b) aşağıdakileri içeren MK-3475, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı:

DİZİ İD NO: 68'de verilen amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken sahası ve DİZİ İD NO: 70'te verilen amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken sahası; veya

DİZİ İD NO: 68'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 70'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken hafif zincir; ve

c) aşağıdakileri içeren Pidilizumab, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı:

DİZİ İD NO: 82'de verilen amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken sahası ve DİZİ İD NO: 84'te verilen amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken sahası; veya

DİZİ İD NO: 82'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 84'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken hafif zincir.

14. İstem 1-9'un kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor bir anti-PD-L1 antikoru, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı olup aşağıdakiler arasından seçilir:

a) aşağıdakileri içeren BMS-936559, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı:

DİZİ İD NO: 92'de verilen amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken sahası ve DİZİ İD NO: 94'te verilen amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken sahası; veya

DİZİ İD NO: 92'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 94'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken hafif zincir;

b) aşağıdakileri içeren MEDI4736, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı:

DİZİ İD NO: 102'de verilen amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken sahası ve DİZİ İD NO: 104'te verilen amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken sahası; veya

DİZİ İD NO: 102'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 104'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken hafif zincir; ve

c) aşağıdakileri içeren MPDL3280A, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı:

DİZİ İD NO: 114'te verilen amino asit dizisinden oluşan bir ağır zincir değişken sahası ve DİZİ İD NO: 115'te verilen amino asit dizisinden oluşan bir hafif zincir değişken sahası; veya

DİZİ İD NO: 114'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 115'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisinden oluşan bir değişken hafif zincir.

15. İstem 1-14'ün herhangi birinin kombinasyonu veya kullanım için kombinasyonu olup, ayrıca bir glukokortikoit içerir.

16. İstem 15'in kombinasyonu veya kullanım için kombinasyonu olup, burada glukokortikoit kortizonlar, deksametazonlar, hidrokortizonlar, metilprendizolonlar, prednizolonler ve prednizonlar arasından seçilir.

17. İstem 1-16'nın herhangi birinin kombinasyonu veya kullanım için kombinasyonu olup, burada hiyalüronidaz ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü aynı uygulama yoluyla veya farklı bir uygulama yoluyla uygulama için formüle edilir.

18. İstem 17'nin kombinasyonu veya kullanım için kombinasyonu olup, burada hiyalüronidaz ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü sistemik uygulama için formüle edilir.

19. İstem 17'nin kombinasyonu veya kullanım için kombinasyonu olup, burada hiyalüronidaz ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü intravenöz uygulama için formüle edilir.

20. İstem 1-19'un kombinasyonu veya kullanım için kombinasyonu olup, burada hayvan hiyalüronidaza bağışık sistemi kontrol noktası inhibitörüne maruz bırakılmadan en fazla 48 saat önce maruz bırakılır.

21. İstem 1-20'nin kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada kanser bir tümördür ve tümör bir katı tümördür.

22. İstem 21'in kombinasyonu, kullanım için kombinasyonu veya kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü olup, burada kanser pankreas kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, mesane kanseri, mide kanseri, mezotelyom, NSCLC ve kolon kanseri arasından seçilir.

TARİFNAME
BİR HİYALÜRONAN AYRIŞTIRICI ENZİM VE BİR BAĞIŞIKLIK KONTROL NOKTASI İNHİBİTÖRÜYLE KOMBİNASYON TERAPİSİ

Açıklama

BULUŞUN ALANI

Burada bir hiyalüronidaz gibi hiyalüronan ayrıştırıcı bir enzim ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün kombinasyonları sunulmaktadır. Kombinasyonlar bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin uygulanmasını içeren herhangi bir terapiyi geliştirmek için kombinasyon tedavisinde kullanılabilir. Kombinasyon terapisi katı (solid) ve katı olmayan tümörler de dâhil olmak üzere kanserleri tedavi etme usullerinde kullanılabilir.

BİLİNEN HUSUSLAR

PH20 gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler kanserler ve özellikle hiyalüronanla ilişkili kanserler veya tümörler de dâhil olmak üzere hiyalüronanla ilişkili hastalıkları veya rahatsızlıkları tedavi etme usullerinde kullanılır. Hiyalüronan (hiyalüronik asit; HA) memelilerde ağırlıklı olarak bağ dokular, cilt, kıkırdak ve eklem sıvısında bulunan bir glikozaminoglikandır. Bağ dokuda, hiyalüronanla ilişkili hidrasyon suyu, dokular arasında hidratlı matrisler yaratır. HA birçok hücrenin hücre dışı matrisinde, özellikle yumuşak bağ dokularda bulunur. Katı tümörler de dâhil olmak üzere, bazı hastalıklar hiyalüronan ekspresyonu ve/veya üretimiyle ilişkilidir. Hiyalüronidazlar hiyalüronanı ayrıştıran enzimlerdir. HA'nın parçalanmasını katalize eden hiyalüronidazlar kanserler ve tümörler de dâhil olmak üzere HA'nın veya başka glikozaminoglikanların birikmesiyle ilişkili hastalıkları veya rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılabilir. Kanserlerin ve özellikle katı tümörlü kanserlerin tedavisi için, geliştirilmiş veya alternatif terapötik tedavilere ihtiyaç vardır.

Scodeller P. (Hyaluronidase and other Extracellular Matrix Degrading Enzymes for Cancer Therapy: New Uses and Nano-Formulations. Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis. (2014) 5(178)) hiyalüronidazın geleneksel kanser ilaçlarıyla, örneğin gemsitabin, karboplatin, adriamisin, lipozomal doksorubisin, onkolitik adenovirüs ICOVIR5 ve radyoterapiyle kombinasyon halinde kullanımı üzerine bir inceleme yapmaktadır. İncelemede, hiyalüronidazlar gibi hücre dışı matris ayrıştırıcı enzimlerin nasıl geleneksel

kanser ilaçlarının tümöre girişini ve tatbikini arttırmak için kullanılabildiği açıklanmaktadır.

Chiu ve diğerleri (Advanced Pancreatic Cancer: Flourishing Novel Approaches in the Era of Biological Therapy. The Oncologist. (2014) 19(9): 937-950) pankreas kanseri terapisine genel bir bakış sunmaktadır. Bu tip kanser için temel tedaviler arasında gemsitabin, FOLFIRINOX ve *nab*-paklitakselin yer aldığını, ama geliştirilmiş tedavilere ihtiyaç duyulduğunu açıklamaktadır. İmmünoterapi ve tedavilerde kişiye özel yaklaşımlar bu tip kanser için tedavinin geliştirilebildiği yollar olarak önerilmektedir.

Callahan ve diğerleri (At the Bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. Journal of Leukocyte Biology. (2013) 94(1): 41-53) kanser tedavisinde CTLA-4 ve PD-1 bloke edici antikorların kullanımını açıklamaktadır.

BULUŞUN ÖZETİ

Bu buluş aşağıdakileri içeren bir kombinasyon tedavisi sunmaktadır:

bir hiyalüronidaz içeren bir ilk bileşim, burada hiyalüronidaz bir polimere konjuge edilir veya yavaş salım için formüle edilir veya bir tümöre tatbik için bir vektör içinde kodlanır; ve

bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü içeren ikinci bir bileşim, burada bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir anti-CTLA4, anti-PD-1 veya anti-PD-L1 antikoru veya bunun antijen bağlayıcı fragmanıdır.

Ayrıca bir hastada bir kanserin tedavisinde kullanım için bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü sunulmakta olup, burada:

hasta bir hiyalüronidazla tedavi edilir;

hiyalüronidaz bir polimere konjuge edilir veya sürekli salım için formüle edilir,

burada bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir anti-CTLA4, anti-PD-1 veya anti-PD-L1 antikoru veya bunun antijen bağlayıcı fragmanıdır.

Kombinasyonlar ve kombinasyon terapisi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim içeren bir ilk bileşimi; ve

istemlerde tanımlandığı gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünü içeren ikinci bir bileşimi haizdir. Bileşimler ayrı ayrı veya birlikte veya ardışık olarak veya aralıklı olarak uygulanabilir. Bileşimler tek bir bileşim olarak formüle edilebilir. Kanserler arasında katı tümörler ve hematolojik kanserler gibi katı olmayan tümörler yer alır. Bu alanda uzman

olanların bildiği gibi kanserler immünosüpresif (bağışıklığı baskılayıcı) olabilir. Kanserlerin immünosüpresif etkilerini tersine çeviren veya inhibe eden veya azaltan, böylece tümörlere ve tümör hücrelerine karşı bağışıklık yanıtını güçlendiren veya yeniden sağlayan tedavi biçimleri geliştirilmiştir. Kombinasyonlar ve burada kullanıma yönelik kombinasyonlar, bu tedavileri tümörler ve tümör hücreleriyle ilişkili hiyalüronan miktarını azaltan maddelerle birleştirmektedir. Bu maddeler hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerdir. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler tedaviyi sağlamak için yeterli serum yarılanma ömrüne sahip olacak şekilde formüle edilir veya modifiye edilir veya üretilir.

Burada kanser tedavisinde kullanım için buradaki istemlere uygun kombinasyonlar sunulmaktadır. Kombinasyonlar tümör/kanser hücrelerinde bulunan hiyalüronan miktarını azaltan bir ilk maddeyi ve immünosüpresif kanser mikroortamını zayıflatan ikinci bir madde içerir. İlk ve ikinci madde ayrı bileşimlerde bulunabilir veya aynı bileşim içinde formüle edilebilir;
ilk ve ikinci madde eş zamanlı ardışık, aralıklı veya herhangi bir sırada uygulanabilir.

Özel düzenlemelerde, katı tümörler ve başka tümörler de dâhil olmak üzere kanserlerin kombinasyon terapisinde kullanım için istemlere uygun kombinasyonlar sunulmaktadır. Kombinasyonlar, bir polimere konjuge edilen veya serum yarılanma ömrünü arttıran bir şekilde formüle veya temin edilen bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, yani hiyalüronidaz içeren bir ilk bileşimi ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü içeren ikinci bir bileşimi haizdir. Bileşimler birlikte formüle edilebilir, ama tipik olarak ayrı ayrı temin edilir ve ayrı ayrı uygulanır. Bunlar ardışık veya aralıklı veya eş zamanlı olarak veya herhangi bir sırada uygulanabilir. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, yani hiyalüronidaz ardışık olarak, kontrol noktası inhibitöründen önce veya sonra, örneğin kontrol noktası inhibitöründen önce uygulanır. Bu düzenlemelerde, genel olarak hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, yani hiyalüronidaz kontrol noktası inhibitöründen 1 veya 2 günden daha kısa bir süre önce, örneğin 48 saat veya daha kısa bir süre önce, örneğin 40, 35, 30, 25, 24, 20, 18, 15, 12, 10, 8, 5 veya daha az saat önce uygulanır. Kontrol noktası inhibitörleri programlı hücre ölümü-ligandı 1 (PD-L1), programlı hücre ölümü proteini 1 (PD-1) veya sitotoksik T lenfositle ilişkili protein 4'ü (CTLA4; CD152 olarak da bilinir) inhibe eden antikorlar ve bunların antijen bağlayıcı fragmanlarıdır. Proteinlerin ve bağışıklık sistemini baskılayan başka faktörlerin inhibisyonu, bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini tanımaya ve onlara saldırmaya devam etmesi için, bağışıklık sisteminin zayıflamasını önler veya azaltır.

Burada örneğin bir çözünür hiyalüronidaz gibi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin veya bir hiyalüronan sentezi inhibitörünün ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün uygulanmasının, bir tümör hücresinin veya kanser hücresinin inhibitörle tedaviye yanıtını arttırabildiği gösterilmektedir. Örneğin bir örnek düzenlemede, CTLA4 veya PD-L1 inhibitörünün uygulanmasından önce bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin uygulanması, tek başına inhibitörle karşılaştırıldığında tümörlerin tedavisini geliştirmektedir.

Burada kanserlerin tedavisinde kullanım için, çözünür bir hiyalüronidaz gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve buradaki istemlere uygun kontrol noktası inhibitörlerinin kombinasyonları sunulmaktadır. Tedaviyi uygulamak veya kombinasyonlardaki bileşimleri kullanmak için, kullanımlar hiyalüronan ayrıştırıcı bir enzim, özellikle bir polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı bir enzim içeren bir ilk bileşim uygulandıktan sonra, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünü içeren ikinci bir bileşimin uygulanmasını içerir. Bu kullanımların herhangi birinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bileşimi ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitör bileşimi aynı uygulama yoluyla veya farklı uygulama yollarıyla uygulanabilir. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bileşimi ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitör bileşimi aynı uygulama yoluyla uygulanabilir. Kullanım için yukarıda açıklanan kombinasyonların herhangi birinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bileşimi ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitör bileşimi sistemik olarak, örneğin intravenöz yolla uygulanabilir.

Kullanıma yönelik kombinasyonların bazı düzenlemelerinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim içeren bileşim kontrol noktası inhibitörünün uygulanmasından önce uygulanır. Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin uygulanmasından sonra 48 saat içinde, örneğin hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulanmasından sonra en az veya en az yaklaşık veya yaklaşık veya 5 dakika, 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat, 12 saat, 16 saat, 18 saat, 20 saat, 22 saat, 24 saat, 30 saat, 36 saat, 40 saat veya 48 saat içinde uygulanabilir. Bazı kullanımlarda, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün uygulanmasından önceki 6 saat ila 30 saat veya 12 saat ila 24 saat (ilk ve son noktalar dâhil) içinde uygulanır. Uygulama zamanı ve sırası gerekliyse spesifik bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri için ampirik olarak belirlenir.

Kullanıma yönelik yukarıda açıklanan kombinasyonların herhangi biri bir tümör, örneğin bir katı tümör olan bir tümör gibi bir kanseri tedavi etmek için kullanılabilir. Bazı

örneklerde, tümörün özelliği orta ila yüksek bir hiyalüronan içeriğine, örneğin yüksek bir hiyalüronan içeriğine sahip olmasıdır. Sunulan kullanıma yönelik kombinasyonlarla tedavi edilebilen kanserlerin örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla pankreas kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, mesane kanseri, mide kanseri, mezotelyom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) ve kolon kanseri yer alır.

Sunulan kullanıma yönelik kombinasyonlarda bulunan hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, serum yarılanma ömrünü artırmak için formüle veya modifiye edilen çözünür hiyalüronidazlar olabilir. Örneğin, hiyalüronidaz, küçükbaş veya büyükbaş hayvan PH20 veya bir C terminal glikosilfosfatidilinozitol (GPI) bağlanma yerinden veya GPI bağlanma yerinin bir bölümünden ari olan beşeri PH20'nin C terminal olarak budanmış bir formu gibi çözünür bir PH20 olabilir, budanmış form hiyalüronidaz aktivitesi gösterir ve çözünebilir. Beşeri PH20 hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler arasında, çözünür, hiyalüronidaz aktivitesini koruyan ve DİZİ İD NO: 217'nin 36-464. amino asit kalıntılarını ve bir C terminal amino asit kalıntısına kadar kalıntıları içeren, DİZİ İD NO: 217'de açıklanan amino asitlerin bitişik bir dizisine sahip olan enzimler yer alır, burada polipeptit, dizisi DİZİ İD NO: 217'nin 1-509. veya 36-509. amino asitleri olarak belirlenen veya buna en az yaklaşık %85 dizi özdeşliğine sahip olan polipeptidin tam uzunluğunu içermemek üzere C terminal olarak budanmıştır. Bazı düzenlemelerde, PH20, DİZİ İD NO: 217'nin 36-464. amino asitlerini ve bir C terminal amino asit kalıntısına kadar kalıntıları içeren DİZİ İD NO: 217'nin bitişik bir amino asit dizisine sahip bir polipeptide en az yaklaşık %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğini haiz bir amino asit dizisine sahiptir, burada polipeptit, dizisi DİZİ İD NO: 217'nin 1-509. veya 36-509. amino asitleri olarak belirlenen polipeptidin tam uzunluğunu içermemek üzere C terminal olarak budanmıştır, çözünebilir ve hiyalüronidaz aktivitesini korur. Örnek PH20 polipeptitleri, DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen amino asit dizisine veya buna en az %85, örneğin en az yaklaşık %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip olan ve hiyalüronidaz aktivitesini koruyan bir amino asit dizisine sahiptir.

Burada kullanılacak kombinasyonlar için hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bir polimerle modifiye edilir. Bazı örneklerde, polimer bir polialkilen glikol, dekstran, pullulan veya selülozdur. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi modifiye edebilen polialkilen glikol polimerleri arasında polietilen glikol (PEG) ve metoksipolietilen glikol (mPEG) yer alır. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin PEG'le modifiye edildiği örneklerde, PEG dallanmış veya doğrusal

olabilir. Örneklerin herhangi birinde, polimer metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil bütanoat (mPEG-SBA) (5 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil bütanoat (mPEG-SBA) (20 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil bütanoat (mPEG-SBA) (30 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil α-metilbütanoat (mPEG-SMB) (20 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil α-metilbütanoat (mPEG-SMB) (30 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-bütiraldehit (mPEG-bütiraldehit) (30 kDa), metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil propionat (mPEG-SPA) (20 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil propionat (mPEG-SPA) (30 kDa); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (10 kDa dallanmış); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (20 kDa dallanmış); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (40 kDa dallanmış); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (60 kDa dallanmış); biyotin-poli(etilen glikol)-N-hidroksisüksinimid ester (biyotin-PEG-NHS) (5 kDa biyotinlenmiş); poli(etilen glikol)-p-nitrofenil karbonat (PEG-p-nitrofenil-karbonat) (30 kDa); veya poli(etilen glikol)-propionaldehit (PEG-propionaldehit) (30 kDa) ile reaksiyonla üretilebilir. Örneklerin herhangi birinde, polimer, molekül ağırlığı 30 veya yaklaşık 30 kilodalton olan bir PEG olabilir.

Burada kanseri tedavi etme örneklerinin herhangi birinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim 0.01 µg/kg ila 100 µg/kg (hasta vücut ağırlığı (BW)), 0.01 µg/kg ila 50 µg/kg, 0.01 µg/kg ila 15 µg/kg, 0.05 µg/kg ila 10 µg/kg, 0.75 µg/kg ila 7.5 µg/kg, 1.0 µg/kg ila 5.0 veya 1.0 µg/kg ila 3.0 µg/kg aralığındaki veya yaklaşık bu aralıktaki bir dozaj aralığı miktarında veya 0.1 ila 5,000 Birim/kg hasta vücut ağırlığı, 0.5 ila 4,000 Birim/kg, 1 ila 1,000 Birim/kg, 1 ila 500 Birim/kg, 5 ila 500 Birim/kg, 10 ila 500 Birim/kg veya 20 ila 400 Birim/kg hasta vücut ağırlığı (BW) aralığındaki veya yaklaşık bu aralıktaki bir dozaj aralığı miktarında uygulanabilir.

Alternatif olarak, yukarıda açıklanan hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler lipozomlar ve başka taşıyıcılar da dâhil olmak üzere lipit veziküller içinde olduğu gibi sürekli salım için formüle edilebilir. Veziküller, kombinasyonda birlikte kullanılacak kontrol noktası inhibitörüne bağlı olarak lenfositler ve/veya tümör hücreleri gibi seçilmiş hücrelere tatbik için hedeflenebilir. Kontrol noktası inhibitörü hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle birlikte formüle edilebilir. Burada açıklandığı gibi, bir çözünür hiyalüronidaz gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, tümörlere tatbik edilmek ve orada eksprese edilmek üzere bir onkolitik vektör gibi bir vektör içinde kodlanabilir veya başka hücrelere ve dokulara tatbik için

hedeflenebilir; kontrol noktası inhibitörü bir protein ise, o da ekspresyon için vektör içinde e kodlanabilir.

Burada sunulan kanser tedavisinde kullanıma yönelik kombinasyonların herhangi birinde, uygulanan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteininin aktivitesini bloke eder, burada bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini CTLA4, PD-1 ve PD-L1'in herhangi biridir ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir antikor veya bunun bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini bağlayan bir fragmanıdır.

Örnek bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor bir anti-PD-L1 antikoru, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanlarıdır. Örnek PD-L1 antikorları arasında, DİZİ İD NO: 92'de verilen amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 94'te verilen amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 92'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 94'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, BMS-936559, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek anti-PD-L1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 102'de verilen amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 104'te verilen amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 102'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 104'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, MEDI4736, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır; ve

Örnek anti-PD-L1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 114'e verilen amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 115'te verilen amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 114'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 115'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95,

%96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, MPDL3280A, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor bir anti-CTLA4 antikoru, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanlarıdır. Örnek anti-CTLA4 antikorları arasında örneğin DİZİ İD NO: 22'de verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 24'te verilen amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını; veya DİZİ İD NO: 22'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 24'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, İpilimumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek anti-CTLA4 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 34'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 36'da verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 34'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 36'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, Tremelimumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Başka bir örnek bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor bir anti-PD-1 antikoru, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanlarıdır. Örnek anti-PD-1 antikorları arasında örneğin DİZİ İD NO: 54'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 56'da verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 54'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 56'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, Nivolumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek anti-PD-1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 68'de verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 70'te verilen bir amino asit

dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 68'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 70'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, MK-3475, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek anti-PD-1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 82'de verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 84'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 82'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 84'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, Pidilizumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri ve tümörlerin immünosüpresif etkilerinin başka inhibitörlerinin dozaj aralıkları bu alanda uzman olanlar tarafından bilinenler olabilir veya kombinasyon terapisi için ampirik olarak belirlenebilir. Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin ve bağışıklığın baskılanmasının başka inhibitörlerinin etkililiğindeki herhangi bir artış sayesinde dozaj azaltılabilir. Benzer bir şekilde hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve hiyalüronan inhibitörlerinin dozajları bu alanda uzman olanların bildiği dozajlar olabilir. Hayvan modellerindeki örnek dozajlar örneklerde açıklanmaktadır. Bu alanda uzman olanlar hayvan modellerinden insanlardaki dozajları hesaplayabilir veya öngörebilirler (örneğin bakınız: Huang ve diğerleri (2014) The application of allometric scaling principles to predict pharmacokinetic parameters across species, Expert Opin Drug Metab Toxicol. 10:1241-53). Örneğin buradaki örneklerde kemirgen modelinde kullanılan PEGPH20'nin bir beşeri eşdeğer dozajı 37.5 µg/kg'dir. Beşeri dozaj 3 µg/kg'dir. Dolayısıyla, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin PEGPH20 olduğu bazı düzenlemelerde, bir anti-PD-L1 antikoru gibi bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle birlikte uygulamada insanlar için dozaj yaklaşık veya 1-10 µg/kg, örneğin 2-4 µg/kg ve özellikle 3 µg/kg'dir. Dozajın hastaya, tedavi rejimine, spesifik maddeye, tolere edilen yan etkiler miktarına, yan etkileri engellemek için uygulanan ek maddelere ve bu tür başka parametrelere bağlı olduğu takdir edilecektir. Bu alanda uzman olanlar buradaki açıklamanın ışığında her maddenin uygun dozajlarını seçebilir.

Örneğin, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir kg vücut ağırlığı için (yaklaşık) 0.1 mg (mg/kg BW) ila yaklaşık 50 mg/kg BW, yaklaşık 0.1 mg/kg ila yaklaşık 20 mg/kg BW, yaklaşık 0.1 ila yaklaşık 10 mg/kg BW, yaklaşık 0.3 ila yaklaşık 10 mg/kg BW, yaklaşık 0.5 mg/kg ila 5 mg/kg BW veya 0.5 mg/kg ila 1 mg/kg BW arasındaki bir dozaj aralığında uygulanabilir. Bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün örnek dozları arasında en az veya en az yaklaşık 0.1 mg/kg, 0.15 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.30 mg/kg, 0.35 mg/kg, 0.40 mg/kg, 0.45 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.55 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.6 mg/kg, 1.7 mg/kg, 1.8 mg/kg, 1.9 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 3.5 mg/kg, 4 mg/kg, 4.5 mg/kg, 5 mg/kg, 5.5 mg/kg, 6 mg/kg, 6.5 mg/kg, 7 mg/kg, 7.5 mg/kg, 8 mg/kg, 8.5 mg/kg, 9 mg/kg, 9.5 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23 mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg veya 50 mg/kg tedavi edilecek hastanın vücut ağırlığı (BW) olan bir dozaj yer alır.

Burada sunulan kombinasyonların veya tedavide kullanıma yönelik kombinasyonların herhangi birinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim herhangi bir uygun sıklıkta, örneğin günde bir kez, iki günde bir, haftada iki kez, haftada bir kez, 2 haftada bir kez, 3 haftada bir kez veya 4 haftada bir kez uygulanabilir; ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle aynı sıklıkta veya farklı bir sıklıkta uygulanabilir, burada her bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü uygulamasından 48 saati aşmayan bir süre önce hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulanır. Örneğin, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü haftada iki kez, haftada bir kez, 2 haftada bir kez, 3 haftada bir kez, 4 haftada bir kez, 6 haftada bir kez, 2 ayda bir kez, 3 ayda bir kez, 4 ayda bir kez, 5 ayda bir kez veya 6 ayda bir kez uygulanabilir; burada her bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü uygulamasından 48 saati aşmayan bir süre önce bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulaması yapılır.

Kullanılabilen bir örnek dozaj rejimi, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin haftada iki kez uygulanmasını, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün ise en fazla haftada bir kez uygulanmasını içerir, burada her bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü uygulamasından 48 saati aşmayan bir süre önce bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulaması yapılır. Örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibisyonu en fazla üç haftada bir kez veya dört haftada bir kez uygulanabilir, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ise haftada iki kez uygulanır. Başka örneklerde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim haftada iki kez

uygulanır ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü haftada iki kez uygulanır, burada her bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü uygulamasından 48 saati aşmayan bir süre önce bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulaması yapılır. Bazı örneklerde, her bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü uygulamasından 24 saati aşmayan bir süre önce bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulaması yapılır.

Burada ayrıca, ayrıca bir glukokortikoit gibi bir kortikosteroidin uygulanmasını içeren, bir kanserin tedavisinde kullanım için, buradaki istemlere uygun kombinasyonlar sunulmaktadır. Glukokortikoit kortizonlar, deksametazonlar, hidrokortizonlar, metilprednizolonlar, prednizolonlar ve prednizonlar arasından seçilebilir. Örneklerin herhangi birinde, kortikosteroid hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin uygulanmasından önce, onunla eş zamanlı olarak, onunla aralıklı olarak veya ondan sonra uygulanabilir. Bazı örneklerde, kortikosteroid hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından önce ve hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından sonra uygulanır. Başka örneklerde kortikosteroid hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle birlikte uygulanır. Bazı örneklerde, bir glukokortikoit gibi kortikosteroid hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından en az veya yaklaşık en az 1 saat önce veya anti-hiyalüronan maddenin uygulanmasından en az 8 saat ila 12 saat sonra uygulanabilir. Örneklerin herhangi birinde, kortikosteroid (yaklaşık) 0.1 ila 20 mg, 0.1 ila 15 mg, 0.1 ila 10 mg, 0.1 ila 5 mg, 0.2 ila 20 mg, 0.2 ila 15 mg, 0.2 ila 10 mg, 0.2 ila 5 mg, 0.4 ila 20 mg, 0.4 ila 15 mg, 0.4 ila 10 mg, 0.4 ila 5 mg, 0.4 ila 4 mg, 1 ila 20 mg, 1 ila 15 mg veya 1 ila 10 mg aralığındaki bir miktarda uygulanabilir. Sunulan usullerin herhangi birinde, kortikosteroid ağızdan uygulanabilir.

Burada ayrıca, tek başına hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle karşılaştırıldığında serum yarılanma ömrünü arttırmak için formüle veya modifiye edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim içeren bir ilk bileşimi; ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünü veya bağışıklığın baskılanmasının başka bir inhibitörünü içeren ikinci bir bileşimi haiz bu buluşa uygun kombinasyonlar sunulmaktadır. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzim polimere konjuge edilebilir veya bir lipozom veya misel veya çok katlı vezikül veya çok veziküllü vezikül gibi bir vezikül içinde veya onunla ilişkili olarak uzatılmış salım için formüle edilebilir veya bir tümör hücresine tatbik edilecek bir gen terapisi vektörü veya onkolitik vektör gibi bir vektör içinde kodlanabilir.

Burada, polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim içeren bir ilk bileşimi ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü içeren ikinci bir bileşimi haiz, buradaki

istemlere uygun kombinasyonlar sunulmaktadır. Sunulan kombinasyonların herhangi birinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bir hiyalüronidaz, örneğin bir PH20 veya bunun bir C terminal glikosilfosfatidilinozitol (GPI) bağlanma yerinden veya GPI bağlanma yerinin bir bölümünden ari olan budanmış formudur. Sunulan kombinasyonların herhangi birinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim beşeri veya beşeri olmayan bir PH20 olabilir. Beşeri PH20 hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler arasında, çözünür olan, hiyalüronidaz aktivitesini koruyan ve DİZİ İD NO: 217'nin 36-464. amino asit kalıntılarını ve bir C terminal amino asit kalıntısına kadar kalıntıları içeren DİZİ İD NO: 217'deki bir bitişik amino asit dizisine sahip enzimlerdir, burada polipeptit C terminal olarak budanarak, dizisi DİZİ İD NO: 217'nin 1-509. veya 36-509. amino asitleri olarak verilen veya buna en az yaklaşık %85 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisine sahip polipeptidin tam uzunluğunu içermez. Bazı örneklerde, PH20, DİZİ İD NO: 217'nin 36-464. amino asit kalıntılarını ve bir C terminal amino asit kalıntısına kadar kalıntıları içeren, DİZİ İD NO: 217'deki bitişik bir amino asit dizisine sahip bir polipeptide en az yaklaşık %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haizdir, böylece polipeptit, çözünür olan ve hiyalüronidaz aktivitesini koruyan, dizisi DİZİ İD NO: 217'nin 1-509. veya 36-509. amino asitleri olarak verilen polipeptidin tam uzunluğunu içermeyecek şekilde C terminal olarak budanır. Örnek PH20 polipeptitleri DİZİ İDNO: 123-158'in herhangi birinde verilen amino asit dizisine veya buna en az %85, örneğin en az yaklaşık %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliği gösteren bir amino asit dizisine sahiptir ve hiyalüronidaz aktivitesini korur.

Buradaki kombinasyonlarda sunulan hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bir polimerle modifiye edilir. Bazı örneklerde, polimer bir polialkilen glikol, dekstran, pullulan veya selülozdur. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi modifiye edebilen polialkilen glikol polimerleri arasında polietilen glikol (PEG) ve metoksipolietilen glikol (mPEG) yer alır. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi PEG'le modifiye edildiği örneklerde, PEG dallanmış veya doğrusal olabilir. Örneklerin herhangi birinde, polimer metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil bütanoat (mPEG-SBA) (5 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil bütanoat (mPEG-SBA) (20 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil bütanoat (mPEG-SBA) (30 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil α-metilbütanoat (mPEG-SMB) (20 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil α-metilbütanoat (mPEG-SMB) (30 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-bütiraldehit (mPEG-bütiraldehit) (30 kDa), metoksi-poli(etilen glikol)-

süksinimidil propionat (mPEG-SPA) (20 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil propionat (mPEG-SPA) (30 kDa); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (10 kDa dallanmış); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (20 kDa dallanmış); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (40 kDa dallanmış); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (60 kDa dallanmış); biyotin-poli(etilen glikol)-N-hidroksisüksinimid ester (biyotin-PEG-NHS) (5 kDa biyotinlenmiş); poli(etilen glikol)-p-nitrofenil karbonat (PEG-p-nitrofenil-karbonat) (30 kDa); veya poli(etilen glikol)-propionaldehit (PEG-propionaldehit) (30 kDa) ile reaksiyonla üretilebilir. Örneklerin herhangi birinde, polimer molekül ağırlığı 30 veya yaklaşık 30 kilodalton olan bir PEG olabilir.

Polimere konjuge edilen hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bileşimi, burada sunulan kombinasyonların herhangi birinde, bir polimere konjuge edilmiş (yaklaşık) 0.1 µg/mL ila 100 µg/mL, 1 µg/mL ila 50 µg/mL veya 1 µg/mL to 20 µg/mL hiyalüronan ayrıştırıcı enzim aralığındaki bir miktarda veya bir polimere konjuge edilmiş (yaklaşık) 10 U/mL ila 5000 U/mL, 50 U/mL ila 4000 U/mL, 100 U/mL ila 2000 U/mL, 300 U/mL ila 2000 U/mL, 600 U/mL ila 2000 U/mL veya 100 U/mL ila 1000 U/mL hiyalüronan ayrıştırıcı enzim aralığı içindeki bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim miktarında olan bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim miktarı içerebilir. Sunulan usulde hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bileşiminin sınırlandırıcı olmayan hacimleri (yaklaşık) 0.5 mL ila 50 mL, 1 mL ila 10 mL veya 1 mL ila 5 mL aralıklarını kapsar.

Sunulan kombinasyonlar ayrıca bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü ihtiva eden bir bileşimi içerir. Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün hedefi CTLA4, PD-1 ve PD-L1 arasından seçilen bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinidir. Sunulan kombinasyonlardaki bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini inhibitörü, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor veya bunun antijen bağlayıcı fragmanıdır.

Sunulan kombinasyonlardaki örnek bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor bir anti-CTLA4 antikoru, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanlarıdır. Örnek anti-CTLA4 antikorları arasında DİZİ İD NO: 22'de verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 24'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 22'de verilen ağır

zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 24'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, İpilimumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Sunulan kombinasyonlardaki örnek anti-CTLA4 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 34'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 36'da verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zinciri veya DİZİ İD NO: 34'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 36'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, Tremelimumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Sunulan kombinasyonlardaki, anti bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı başka bir örnek bir anti-PD-1 antikoru, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanlarıdır. Örnek anti-PD-1 antikorları arasında örneğin DİZİ İD NO: 54'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 56'da verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zinciri veya DİZİ İD NO: 54'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 56'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, Nivolumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek anti-PD-1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 68'de verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 70'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 68'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 70'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, MK-3475, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek anti-PD-1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 82'de verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 84'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 82'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 84'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, Pidilizumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı başka bir örnek antikor bir anti-PD-L1 antikoru, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanlarıdır. Örnek PD-L1 antikorları arasında, DİZİ İD NO: 92'de verilen amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 94'te verilen amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 92'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 94'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, BMS-936559, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Sunulan kombinasyonlardaki örnek anti-PD-L1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 102'de verilen amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 104'te verilen amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 102'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 104'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, MEDI4736, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Sunulan kombinasyonlardaki örnek anti-PD-L1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 114'e verilen amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 115'te verilen amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 114'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 115'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91,

%92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, MPDL3280A, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Burada sunulan kombinasyonların herhangi birinde, bileşimdeki bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, (yaklaşık) 0.5 mg/mL ila 50 mg/mL, 1 mg/mL ila 10 mg/mL veya 2 mg/mL ila 6 mg/mL arasından seçilen bir miktarda temin edilebilir. Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bileşimde en az veya yaklaşık en az 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL veya 10 mg/mL miktarında da bulunabilir. Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünü içeren bileşim, (yaklaşık) 0.5 mL ila 500 mL, 1 mL ila 50 mL veya 10 mL ila 40 mL aralığındaki bir hacimde bulunabilir. Bazı örneklerde, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitör bileşimi en az veya en az yaklaşık 1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL veya 100 mL hacminde bulunur.

Burada sunulan kombinasyonların herhangi biri, polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bileşimlerinin yanı sıra bir kortikosteroid içerebilir. Sunulan kombinasyonlara dâhil edilebilen bir örnek kortikosteroid bir glukokortikoidi içerir. Örnek glukokortikoitler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla kortizonlar, deksametazonlar, hidrokortizonlar, metilprednizolonlar, prednizolonlar ve prednizonlar yer alır.

Burada ayrıca, bir kanserin tedavisinde kullanım için farmasötik kombinasyonlar gibi kombinasyonlar sunulmaktadır. Örneğin burada, bir hayvanda bir kanserin tedavisinde kullanım için kombinasyonlar sunulmakta olup, burada hayvan ilk olarak bir polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzime maruz bırakılır ve sonra bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle temas ettirilir. Sunulan kombinasyonların herhangi birinin bir hayvanda kanseri tedavi etmeye yönelik bir ilacın hazırlanması için kullanımları da açıklanmakta olup, burada bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü ve hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin her biri farmasötik olarak kabul edilebilir bir formdadır ve hayvan, örneğin bir insan, bir polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzime veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin serum yarılanma ömrü arttırılmış başka bir formuna maruz bırakılır ve ayrıca bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle temas ettirilir. Bir çözünür hiyalüronidaz gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, kontrol noktası inhibitörüyle birlikte, kontrol noktası inhibitöründen önce, onunla aralıklı olarak veya art arda uygulanabilir. Bazı düzenlemelerde, hayvan, örneğin bir insan ilk olarak bir polimere

konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzime maruz bırakılır ve sonra bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle temas ettirilir.

Sunulan kombinasyonların veya kullanıma yönelik kombinasyonların herhangi birinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü aynı uygulama yoluyla veya farklı uygulama yollarıyla uygulama için formüle edilebilir. Sunulan kombinasyonların ve kullanıma yönelik kombinasyonların bazı örneklerinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü aynı uygulama yoluyla uygulanır. Örneğin sunulan kombinasyonların veya kullanıma yönelik kombinasyonların herhangi birinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü ağızdan, intravenöz (IV), subkütanöz, intramüsküler, intratümöral, intradermal, topikal, transdermal, rektal, intratekal veya subepidermal uygulama için formüle edilir. Özel örneklerde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü intravenöz uygulama gibi sistemik uygulama için formüle edilir.

Sunulan kombinasyonların veya kullanıma yönelik formülasyonların herhangi birinde hayvan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüne maruz bırakılmadan en fazla 48 saat önce, örneğin hayvan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüne maruz bırakılmadan en az veya en az yaklaşık 5 dakika, 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat, 12 saat, 16 saat, 18 saat, 20 saat, 22 saat, 24 saat, 30 saat, 36 saat, 40 saat veya 48 önce hayvan hiyalüronan ayrıştırıcı enzime maruz bırakılabilir, dolayısıyla hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitöründen en az 5 dakika, 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat, 12 saat, 16 saat, 18 saat, 20 saat, 22 saat, 24 saat, 30 saat, 36 saat, 40 saat veya 48 saat önce uygulanmak üzere formüle edilir.

Burada sunulan kombinasyonların veya bir kanseri tedavi etmek için kullanıma yönelik kombinasyonların herhangi biri bir tümör, örneğin katı tümör olan bir kanseri tedavi etmek için olabilir. Kullanıma yönelik kombinasyonlar hiyalüronanın bir rol oynadığı başka kanserleri tedavi etmek için de kullanılabilir. Örneğin, kanserin ilerlemesinin önemli bir bileşeni olan hiyalüronan (HA) hiyalüronan sentazlar (HAS'lar) tarafından sentezlenir. Kanser hücrelerinde, hiyalüronan sentaz 1 (HAS1) pre-mRNA anormal bir uç birleşimiyle, hemen hemen sadece habis hücrelerde oluşan ve hücre dışı ve hücre içi HA'yı sentezleyen bir anormal uç birleşimi varyantları familyasını (HASIV'ler) üretir. Anormal HASIV'lerin

ekspresyonu, örneğin multipl miyelomda kötü hayatta kalımı öngörür (örneğin bakınız: Adamia ve diğerleri (2014) Adv. Cancer Res. 123:67-94). Hücre dışı HA habis yayılmaya katkıda bulunabilir; ve hücre içi HA onkogenezde bir rol oynayabilir (örneğin bakınız: Adamia ve diğerleri (2014) Adv. Cancer Res. 123:61-94). Özel örneklerde, tümörün özelliği orta ila yüksek bir hiyalüronan içeriğine, örneğin yüksek bir hiyalüronan içeriğine sahip olmasıdır. Burada sunulan kombinasyonlarla ve kullanıma yönelik kombinasyonlarla tedavi edilecek kanserlerin sınırlandırıcı olmayan örnekleri arasında pankreas kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, mesane kanseri, mide kanseri, mezotelyom, NSCLC ve kolon kanseri yer alır.

Burada ayrıca bir hastada bir kanserin tedavisinde kullanım için buradaki istemlere uygun bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri sunulmakta olup, burada hasta hiyalüronan ayrıştırıcı bir enzimle tedavi edilmiştir ve hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bir polimere konjuge edilmiştir. Kullanıma yönelik bu tür bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinde, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteininin aktivitesini bloke edebilir. Sunulan kullanıma yönelik bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri için, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü hedefleri CTLA4, PD-1 ve PD-L1'dir. Kanseri tedavi etmeye yönelik kullanım için sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri arasında antikorlar ve bunların bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini bağlayıcı fragmanları arasından seçilen bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini inhibitörleri yer alır. Özel örneklerde, kullanım için sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini inhibitörü, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikoru veya bunun antijen bağlayıcı fragmanı olan bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünü içerir.

Kullanım için sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri arasında bir anti-CTLA4 antikoru, bunun bir türevi ve bunun antijen bağlayıcı fragmanı olan bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor yer alır. Örnek anti-CTLA4 antikorları arasında DİZİ İD NO: 22'de verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 24'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 22'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 24'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine

sahip bir değişken hafif zinciri haiz, İpilimumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek anti-CTLA4 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 34'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 36'da verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 34'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 36'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, Tremelimumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Kullanım için sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri arasında bir anti-PD-L1 antikoru, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı fragmanı olan bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor da yer alır. Örnek PD-L1 antikorları arasında, DİZİ İD NO: 92'de verilen amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 94'te verilen amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 92'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 94'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, BMS-936559, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek PD-L1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 102'de verilen amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 104'te verilen amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 102'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 104'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, MEDI4736, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek PD-L1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 114'e verilen amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 115'te verilen amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 114'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99

dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 115'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, MPDL3280A, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Kullanım için sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri arasında, bir anti-PD-1 antikoru, bunun bir türevi veya bunun antijen bağlayıcı fragmanı olan bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor da yer alır. Örnek anti-PD-1 antikorları arasında DİZİ İD NO: 54'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 56'da verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 54'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 56'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, Nivolumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek anti-PD-1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 68'de verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 70'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 68'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 70'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, MK-3475, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Örnek anti-PD-1 antikorları arasında ayrıca DİZİ İD NO: 82'de verilen bir amino asit dizisine sahip bir ağır zincir değişken sahasını ve DİZİ İD NO: 84'te verilen bir amino asit dizisine sahip bir hafif zincir değişken sahasını veya DİZİ İD NO: 82'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken ağır zinciri ve DİZİ İD NO: 84'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir değişken hafif zinciri haiz, Pidilizumab, bunun türevleri ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları yer alır.

Kullanım için sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri arasında (yaklaşık) 0.5 mg/mL ila 50 mg/mL, 1 mg/mL ila 10 mg/mL veya 2 mg/mL ila 6 mg/mL aralığı; ve en az 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL veya 10 mg/mL arasından seçilen bir konsantrasyonda uygulama için formüle edilen bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini inhibitörü yer alır. Bu formülasyonlar bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünü (yaklaşık) 0.5 mL ila 500 mL, 1 mL ila 50 mL veya 10 mL ila 40 mL; veya en az 1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL veya 100 mL olan bir hacimde içerebilir.

Kullanım için sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin herhangi birinde, hasta bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzime maruz bırakılır. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bir hiyalüronidaz, örneğin bir PH20 veya bunun C terminal glikosilfosfatidilinozitol (GPI) bağlanma yerini veya GPI bağlanma yerinin bir bölümünü içermeyen budanmış formu olabilir. Böyle bir PH20 beşeri veya başarı olmayan bir PH20 olabilir. Örneğin hiyalüronan ayrıştırıcı enzim DİZİ İD NO: 217'nin 36-464. amino asitlerini ve bir C terminal amino asit kalıntısına kadar kalıntıları içeren, DİZİ İD NO: 217'deki bitişik bir amino asit dizisine sahip C terminal olarak budanmış bir PH20 olabilir, böylece polipeptit, çözünebilen ve hiyalüronidaz aktivitesini koruyan, dizisi DİZİ İD NO: 217'nin 1-509. veya 36-509. amino asitleri olarak veya bunun en az %85 dizi özdeşliğine sahip bir varyantı olarak verilen polipeptidin tam uzunluğunu içermeyen C-terminal olarak budanmış polipeptiddir. Bazı örneklerde, varyant PH20, DİZİ İD NO: 217'nin 36-464. amino asitlerini ve bir C terminal amino asit kalıntısına kadar kalıntıları içeren DİZİ İD NO: 217'nin amino asit dizisine en az %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliği gösteren bir amino asit dizisine sahip olabilir, böylece çözünür olduğu ve hiyalüronidaz aktivitesini koruduğu sürece, polipeptit, dizisi DİZİ İD NO: 217'nin 1-509. veya 36-509. amino asitleri olarak verilen polipeptidin tam uzunluğunu içermeyecek şekilde C terminal olarak budanır. Bu PH20 enzimlerinin örnekleri arasında DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen bir amino asit dizisine veya DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen bir amino asit dizisine en az %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliği gösteren bir amino asit dizisine sahip ve hiyalüronidaz aktivitesini koruyan herhangi bir PH20 yer alır.

Kanser tedavisinde kullanım için sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri arasında polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim yer alır. Enzime

konjuge edilebilen polimerlerin sınırlandırıcı olmayan örnekleri polialkilen glikol, dekstran, pullulan ve selülozdur. Bazı örneklerde, polimer polietilen glikol (PEG) ve metoksipolietilen glikol (mPEG) arasından seçilen bir polialkilen glikol olup, burada PEG dallanmış veya doğrusal bir PEG'dir. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzime konjuge edilen polimer metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil bütanoat (mPEG-SBA) (5 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil bütanoat (mPEG-SBA) (20 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil bütanoat (mPEG-SBA) (30 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil α-metilbütanoat (mPEG-SMB) (20 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil α-metilbütanoat (mPEG-SMB) (30 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-bütiraldehit (mPEG-bütiraldehit) (30 kDa), metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil propionat (mPEG-SPA) (20 kDa); metoksi-poli(etilen glikol)-süksinimidil propionat (mPEG-SPA) (30 kDa); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (10 kDa dallanmış); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (20 kDa dallanmış); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (40 kDa dallanmış); (metoksi-poli(etilen glikol))$_2$-N-hidroksisüksinimid ester (mPEG$_2$-NHS) (60 kDa dallanmış); biyotin-poli(etilen glikol)-N-hidroksisüksinimid ester (biyotin-PEG-NHS) (5 kDa biyotinlenmiş); poli(etilen glikol)-p-nitrofenil karbonat (PEG-p-nitrofenil-karbonat) (30 kDa); veya poli(etilen glikol)-propionaldehit (PEG-propionaldehit) (30 kDa) ile reaksiyonla üretilebilir. Özel örneklerde, polimer molekül ağırlığı 30 veya yaklaşık 30 kilodalton olan bir PEG'dir.

Kanseri tedavi etmeye yönelik kullanım için sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü ağızdan, intravenöz (IV), subkütanöz, intramüsküler, intratümöral, intradermal, topikal, transdermal, rektal, intratekal veya subepidermal uygulama için formüle edilebilir. Özel örneklerde, kullanılacak bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü intravenöz uygulama gibi sistemik uygulama için formüle edilir. Sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, hasta hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle tedavi edildikten sonra 48 saate kadar, örneğin hasta hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle tedavi edildikten en az veya en az yaklaşık veya 5 dakika, 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat, 12 saat, 16 saat, 18 saat, 20 saat, 22 saat, 24 saat, 30 saat, 36 saat, 40 saat veya 48 saat sonra kullanım için formüle edilebilir.

Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin herhangi biriyle tedavi edilen kanser bir tümör, örneğin bir katı tümör olabilir. Özel örneklerde, tümörün özelliği orta ila yüksek bir hiyalüronan içeriğine, örneğin yüksek bir hiyalüronan içeriğine sahip olmasıdır. Bağışıklık

sistemi kontrol noktası inhibitörleriyle tedavi edilen önek kanserler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla pankreas kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, mesane kanseri, mide kanseri, mezotelyom, NSCLC ve kolon kanseri yer alır.

AYRINTILI AÇIKLAMA

Taslak

A. Tanımlar

B. Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası ve Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzim Kombinasyon Terapisi

1. Katı Tümörler ve Bağışıklık Yanıtı

2. Tümörlerde T-Hücresi Aktivitesinin Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası Modülasyonu

a. CTLA-4 ve T-Hücresi Tetikleme (Priming)

b. PD-1 ve T-Hücresi Efektör Fazı

c. Başka İmmünomodülatör Maddeler (örneğin LAG-3)

3. Bir Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörüyle Kombinasyon Terapisinde Polimere Konjuge Edilmiş Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzim

C. Kombinasyon Terapisi Maddeleri

1. Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörleri ve Bunların Formülasyonları

a. Anti- CTLA-4 Terapileri

(i) İpilimumab ve Türevleri

(ii) Tremelimumab ve Türevleri

b. Anti-PD-1 ve Anti PD-1L Terapileri

(i) Anti-PD-1 antikorları

(a) Nivolumab ve Türevleri

(b) MK-3475 ve Türevleri

(c) Pidilizumab ve Türevleri

(ii) Anti-PD-Ll antikorları

(a) BMS-936559 ve Türevleri

(b) MPDL3280A ve Türevleri

(c) MEDI4736 ve Türevleri

c. Başka İmmünomodülatör Tedaviler

2. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzimler ve Polimere Konjuge Edilmiş Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzimler

a. Hiyalüronidazlar

i. Memeli Tipi Hiyalüronidazlar PH20

ii. Bakteriyel Hiyalüronidaz

iii. Sülükler, Başka Parazitler ve Kabuklulardan Hiyalüronidazlar

b. Başka Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzimler

c. Çözünür Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzimler

i. Çözünür Beşeri PH20

ii. rHuPH20

d. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzimlerin Glikosilasyonu

e. Sürekli veya Kontrollü Salım Formülasyonları ve Çözünür Hiyalüronidazları kodlayan Vektörler

i. Modifiye (Polimere Konjuge) edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler PEGillenmiş Çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler

ii. Sürekli veya Kontrollü Salım Formülasyonları ve Çözünür Hiyalüronidazları kodlayan vektörler

a) Çok Veziküllü Lipozomlar (MVL)

b) MVL Ortak Formülasyonları

D. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzimler ve Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörlerinin (örneğin Antikorlar) Nükleik Asitlerini ve Kodlanmış Polipeptitlerini Üretmenin Usulleri

1. Polipeptitleri Kodlayan Nükleik Asidin İzolasyonu veya Hazırlanması

a. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzim

b. Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörü (örneğin antikorlar)

2. Vektörler

3. Hücreler ve Ekspresyon

a. Prokaryotik Hücreler

b. Maya Hücreleri

c. Böcek Hücreleri

d. Memeli hücreleri

e. Bitkiler

4. Saflaştırma Teknikleri

5. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzim Polipeptitlerinin PEGilasyonu

E. Farmasötik Bileşimler ve Formülasyonlar

1. Formülasyon

a. Enjekte Edilebilir Ürünler, Çözeltiler ve Emülsiyonlar,

b. Liyofilize Tozlar

c. Başka Uygulama Yolları için Bileşimler

2. Formülasyon Miktarları

a. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzim Formülasyonları

b. Kontrol Noktası İnhibitörü Formülasyonları

3. Ambalajlama ve İmalat Ürünleri

F. Aktivite, Biyoyararlanım ve Farmakokinetiği İzleme ve Değerlendirme Usulleri

1. Hiyalüronidaz Aktivitesi

2. Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörü Aktivitesi

3. Kombinasyon Terapisinin Kansere Karşı Aktivitesi

a. Tümör Büyümesi ve Hacmi

b. Tümör Markörlerinin Varlığı

c. İmmünolojik İzleme

(i) Periferal Kanda Spesifik Hücre Tiplerinin Sıklığı

(ii) Bağışıklık Sistemi Hücre Markörlerinin Saptanması

(iii) Antijene Spesifik Bağışıklık Yanıtları

4. Farmakokinetik ve Farmakodinamik Tahliller

G. Kombinasyon Terapisi Usulleri ve Kullanımları

1. Kanserler

2. Tedavi için Hastaların Seçilmesi

a. Tümörlerin hiyalüronan içeriğinin ölçülmesi

(i) Hiyalüronan Bağlayıcı Protein (HABP)

(ii) Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Usuller

(iii) Katı Faz Bağlama Tahlilleri

(iv) *İn vivo* Görüntüleme Tahlilleri

b. Tedavi Öncesi Lenfosit Sayımı

2. Dozaj ve Uygulama

3. Dozaj Rejimi: Uygulama Sıklığı ve Döngüsü

4. Ek Kombinasyon Terapisi

a. Kortikosteroid

b. Kansere Karşı Maddeler ve Başka Tedaviler

H. Örnekler

A. Tanımlar

Başka türlü tanımlanmadıkça burada kullanılan bütün teknik ve bilimsel terimler, buluşun/buluşların ait olduğu alanda uzman olanların genel olarak anladığıyla aynı anlama sahiptir. Burada terimler için birden fazla tanım verilmesi durumda, bu bölümdeki tanımlar geçerlidir. Bir URL'ye veya bu tür başka bir tanıtıcı veya adrese referansta bulunulduğunda, bu tanıtıcıların değişebileceği ve internet üzerindeki spesifik bilginin

değişebileceği, ama internet araştırılarak eşdeğer bilginin bulunabileceği takdir edilecektir. Referans, bu tür bilginin mevcut olduğunu ve kamusal olarak yayıldığını kanıtlamaktadır.

Burada "kombinasyon terapisi" terimi, tek bir hastalığı tedavi etmek için bir hastaya iki veya daha fazla terapötik maddenin, örneğin en az iki veya en az üç terapötik maddenin verildiği bir tedaviyi belirtmek için kullanılmaktadır. Buradaki amaçlar için, kombinasyon terapisi polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini bloke edici maddeyle tedaviyi içerir.

Burada "bağışıklık sistemi kontrol noktaları" terimi, bağışıklık sisteminin, kendine toleransı korumak ve ek doku hasarını en aza indirmek için periferal dokulardaki fizyolojik bağışıklık yanıtlarının süresini ve genişliğini modüle etmekten sorumlu olan inhibitör yollarını belirtmek için kullanılmaktadır. Bağışıklık sistemi kontrol noktaları, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinleri tarafından regüle edilir.

Burada, bir "bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini", tipik olarak bir bağışıklık yanıtının derecesini regüle veya modüle eden bir reseptör (örneğin CTLA4 veya PD-1) veya bir liganddır (örneğin PD-L1). Bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinleri inhibitör veya stimülatör olabilir. Özellikle, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinleri bağışıklık yanıtı aktivasyonunun inhibitörleridir. Dolayısıyla, bir inhibitör bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini, T hücresi aktivasyonu ve proliferasyonu gibi bir bağışıklık yanıtını stimüle veya aktive etme etkisi yapar

Burada bir "bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü" veya "bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibe edici madde" veya "bağışıklık sistemi kontrol noktası bloke edici madde" terimleri, bir inhibitör bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini bağlayan ve aktivitesini bloke eden bir maddeyi belirtmek için kullanılmaktadır. İnhibisyon rekabetçi veya sterik veya allosterik olabilen rekabetçi olmayan inhibisyon olabilir. Bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteininin bir bağışıklık sistemi stimüle edici protein olduğu durumlarda, bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, bağışıklık sistemini stimüle edici proteinin aktivitesini, örneğin stimülatör bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini bağlayarak ve aktive ederek veya stimülatör bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini inhibitörlerine müdahale ederek, örneğin bağlayarak veya etkisizleştirerek inhibe etmek suretiyle destekler. Bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün bir örneği, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikordur.

Bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün bir "hedefi", bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün veya bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibe edici maddenin aktiviteyi bloke etmek için bağlandığı bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinidir. Tipik olarak, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü spesifik olarak hedefe bağlanır. Örneğin, ipilimumab adı verilen örnek anti-CTLA4 antikorunun hedefi CTLA4'tür.

Burada "antikor" terimi, immünoglobülin molekülünün değişken ağır zincir ve hafif zincir bölgesinin, en azından bir antijen bağlama yeri oluşturmak ve birleştiklerinde antijeni spesifik olarak bağlamak için yeterli olan bir bölümünü içeren herhangi bir fragman da dâhil olmak üzere, doğal veya kısmen veya tamamen sentetik olarak, örneğin rekombinant olarak üretilen immünoglobülinleri ve immünoglobülin fragmanlarını belirtmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla, bir antikor bir immünoglobülin antijen bağlanma sahasına (antikor birleşme yeri) homolog veya esas itibarıyla homolog olan bir bağlanma sahasına sahip herhangi bir proteini kapsar. Örneğin bir antikor, iki ağır zincir (H ve H' olarak belirtilebilir) ve iki hafif zincir (L ve L' olarak belirtilebilir) içeren, her ağır zincirin tam uzunlukta bir immünoglobülin ağır zinciri veya bunun bir antijen bağlanma yeri oluşturmak için yeterli bir bölümü olabildiği (örneğin ağır zincirler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla V_H zincirleri, V_H-C_H1 zincirleri ve V_H-C_H1-C_H2-C_H3 zincirleri yer alır) ve her hafif zincirin tam uzunlukta bir hafif zincir veya bunun bir antijen bağlanma yeri oluşturmak için yeterli bir bölümü olabildiği (örneğin hafif zincirler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla V_L zincirleri ve V_L-C_L zincirleri yer alır) bir antikoru belirtmektedir. Her ağır zincir (H ve H') bir hafif zincirle (sırasıyla L ve L') eşleşir. Tipik olarak, antikorlar asgari olarak değişken ağır (V_H) zincirin ve/veya değişken hafif (V_L) zincirin tamamını veya en azından bir bölümünü içerir. Antikor, sabit bölgenin tamamını veya bir bölümünü de içerebilir.

Buradaki amaçlar için, antikor terimi tam uzunlukta antikorları ve antikor fragmanları da dâhil olmak üzere bunların bölümlerini içermektedir. Antikor fragmanları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab fragmanları, Fab' fragmanları, $F(ab')_2$ fragmanları, Fv fragmanları, disülfüre bağlı Fv'ler (dsFv), Fd fragmanları, Fd' fragmanları, tek zincirli Fv'ler (scFv), tek zincirli Fab'lar (scFab), diakorlar, anti-idiyotipik (anti-Id) antikorlar veya yukarıdakilerin herhangi birinin antijen bağlayıcı fragmanları yer alır. Antikor sentetik antikorlar, rekombinant olarak üretilmiş antikorlar, multispesifik antikorlar (örneğin bispesifik antikorlar), beşeri antikorlar, beşeri olmayan antikorlar, beşeri özellikler verilmiş antikorlar, kimerik antikorlar ve intrakorları da kapsar. Burada sunulan

antikorlar arasında immünoglobülinlerin herhangi bir tipinin (örneğin IgG, IgM, IgD, IgE, IgA ve IgY), herhangi bir sınıfının (örneğin IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 ve IgA2) veya alt sınıfının (örneğin IgG2a ve IgG2b) üyeleri yer alır.

Burada bir antikorun bir formu, bir antikorun spesifik bir yapısını belirtmek için kullanılmaktadır. Burada antikorlar arasında tam uzunlukta antikorlar ve bunların bölümleri, örneğin bir Fab fragmanı veya başka antikor fragmanı yer alır. Dolayısıyla, bir Fab bir antikorun spesifik bir formudur.

Burada, bir antikorun "karşılık gelen bir formuna" referans, iki antikorun bir özelliği veya aktivitesi karşılaştırılırken, özelliğin antikorun aynı formu kullanılarak karşılaştırıldığı anlamında kullanılmaktadır. Örneğin, bir antikorun, bir ilk antikorun karşılık gelen formunun aktivitesiyle karşılaştırıldığında daha az aktiviteye sahip olduğu söyleniyorsa, bu, antikorun bir Fab gibi spesifik bir formunun, ilk antikorun Fab formuyla karşılaştırıldığında daha az aktiviteye sahip olduğu anlamına gelmektedir.

Burada tam uzunlukta bir antikor terimi, antikor salgılayıcı B hücreleri tarafından üretilen beşeri antikorlar ve sentetik olarak üretilen aynı sahalara sahip antikorlar gibi, iki tam uzunlukta ağır zincire (örneğin V_H-C_H1-C_H2-C_H3 veya V_H-C_H1-C_H2-C_H3-C_H4) ve iki tam uzunlukta hafif zincire (V_L-C_L) ve menteşe bölgelerine sahip olduğu anlamında kullanılmaktadır.

Burada antikor fragmanı veya antikor bölümü terimleri, tam uzunlukta bir antikorun, tam uzunluktan az olan, ama antikorun değişken bölgesinin en azından bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü (örneğin bir veya daha fazla CDR) içeren ve dolayısıyla tam uzunlukta antikorun bağlama spesifitesini ve/veya bir aktivitesini koruyan herhangi bir bölümünü belirtmek için kullanılmaktadır; antikor fragmanları arasında tam uzunlukta antikorların enzimatik işlemiyle üretilen antikor türevlerinin yanı sıra, sentetik olarak, örneğin rekombinant olarak üretilen türevler yer alır. Antikor fragmanlarının örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab, Fab', $F(ab)_2$, tek zincirli Fv'ler (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd fragmanları yer alır (örneğin bakınız: Methods in Molecular Biology, Cilt 207: Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols (2003); Bölüm 1; sayfa 3-25, Kipriyanov). Fragman örneğin disülfür köprüleriyle ve/veya peptit bağlayıcılarla birbirine bağlı birden fazla zincir içerebilir. Bir antikor fragmanı genellikle yaklaşık 50 amino asit ve tipik olarak en az 200 amino asit içerir.

Buradaki kullanıma göre, bir Fv antikor fragmanı terimi, kovalent olmayan etkileşimlerle bağlı olan bir değişken ağır saha (V_H) ve bir değişken hafif (V_L) sahadan oluşur.

Burada bir dsFv, V_H-V_L çiftini stabilize eden, tasarlanmış bir moleküller arası disülfür bağına sahip bir Fv'yi belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada bir Fd fragmanı terimi, bir antikorun, bir antikor ağır zincirinin bir değişken sahasını (V_H) ve bir sabit bölge sahasını (C_H1) içeren bir fragmanını belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada bir Fab fragmanı terimi, tam uzunlukta bir immünoglobülinin papainle sindiriminden kaynaklanan bir antikor fragmanını veya sentetik olarak, örneğin rekombinant usullerle üretilen aynı yapıya sahip bir fragmanı belirtmek için kullanılmaktadır. Bir Fab fragmanı bir hafif zincir (bir V_L ve C_L içerir) ve bir ağır zincirin bir değişken sahasını (V_H) ve ağır zincirin bir sabit bölge sahasını (C_H1) ihtiva eden başka bir zincir içerir.

Burada, bir $F(ab')_2$ fragmanı terimi, bir immünoglobülin pH 4.0-4.5'te pepsinle sindiriminden kaynaklanan bir antikor fragmanını veya sentetik olarak, örneğin rekombinant usullerle üretilen aynı yapıya sahip bir fragmanı belirtmek için kullanılmaktadır. $F(ab')_2$ fragmanı esas olarak iki Fab fragmanından oluşur, burada her ağır zincir bölümü iki fragmanı birleştiren disülfür bağları oluşturan sistein kalıntıları da dâhil olmak üzere, birkaç ek amino asit içerir.

Burada bir Fab' fragmanı terimi, $F(ab')_2$ fragmanının bir yarısını (bir ağır zincir ve bir hafif zincir) içeren bir fragmanı belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada bir Fd' fragmanı, bir antikorun, bir $F(ab')_2$ fragmanının bir ağır zincir bölümünü içeren bir fragmanı olarak kullanılmaktadır.

Burada bir Fv' fragmanı, bir antikor molekülünün sadece V_H ve V_L sahalarını içeren bir fragmanı olarak kullanılmaktadır.

Burada, hsFv terimi, bir Fab fragmanında normal olarak bulunan sabit sahaların bir heterodimerik çift kıvrım (coiled-coil) sahasıyla sübstitüe edildiği antikor fragmanlarını belirtmek için kullanılmaktadır (örneğin bakınız: Arndt ve diğerleri (2001) J Mol Biol. 7:312:221-228).

Burada, bir scFv fragmanı, bir polipeptit bağlayıcıya herhangi bir sırada kovalent olarak bağlı bir değişken hafif zincir (V_L) ve değişken ağır zincir (V_H) içeren bir antikor

fragmanını belirtmek için kullanılmaktadır. Bağlayıcı, iki değişken sahanın önemli müdahale olmadan köprüleneceği bir uzunluktadır. Örnek bağlayıcılar, çözünürlüğü arttırmak için aralarına bir miktar Glu veya Lys kalıntısının dağıtıldığı $(Gly\text{-}Ser)_n$ kalıntılarıdır.

Burada, diakorlar terimi dimerik scFv'yi belirtmek için kullanılmaktadır; diakorlar tipik olarak scFv'lerden daha kısa peptit bağlayıcılara sahiptir ve tercihli olarak dimerize olur.

Burada, bir polipeptit "sahası" terimi, bir polipeptidin yapısal olarak ve/veya işlevsel olarak ayırt edilebilir veya tanımlanabilir bir kısmı (üç veya daha fazla, genellikle 5, 10 veya daha fazla amino asit içeren bir dizi) olarak kullanılmaktadır. Örnek bir polipeptit sahası, polipeptidin, bir polipeptit içinde bir veya daha fazla yapısal motiften (örneğin ilmek bölgeleriyle bağlanmış alfa helisler ve/veya beta iplikleri kombinasyonları) oluşan bağımsız bir şekilde katlanmış bir yapı oluşturabilen ve/veya enzimatik aktivite, dimerizasyon veya antijen bağlama gibi spesifik bir işlevsel aktiviteyle tanınan bir kısmıdır. Bir polipeptit bir veya daha fazla, tipik olarak birden fazla ayrı saha içerebilir. Örneğin, polipeptit bir veya daha fazla yapısal sahaya ve bir veya daha fazla işlevsel sahaya sahip olabilir. Tek bir polipeptit sahası yapı ve işlev temelinde ayırt edilebilir. Bir saha amino asitlerin bitişik bir doğrusal dizisini kapsayabilir. Alternatif olarak, bir saha, polipeptidin amino asitlerinin doğrusal dizisi boyunca bitişik olmayan, birçok bitişik olmayan amino asit bölümünü kapsayabilir. Tipik olarak, bir polipeptit birçok saha içerir. Örneğin bir antikor molekülünün her ağır zinciri ve her hafif zinciri, her biri yaklaşık 110 amino asit uzunluğunda olan birçok immünoglobülin (Ig) sahası içerir. Bu alanda uzman olanlar, polipeptit sahalarına aşinadırlar ve bu tür başka sahalarla yapısal ve/veya işlevsel homolojileriyle bunları belirleyebilirler. Burada örnek olarak tanımlar verilmektedir, ama spesifik sahaları adıyla tanımanın bu alanda uzman olanların becerileri dâhilinde olduğu takdir edilecektir. Gerekli olursa, sahaları belirlemek için uygun yazılım kullanılabilir. Burada, bir antikora referansla bir değişken saha, farklı antikorlarda farklı olan bir amino asit dizisi içeren bir antikor ağır veya hafif zincirinin spesifik bir Ig sahası olarak kullanılmaktadır. Her hafif zincir ve her ağır zincir bir değişken bölge sahasına (V_L ve V_H) sahiptir. Değişken sahalar antijen spesifitesi verir ve dolayısıyla antijen tanımadan sorumludur. Her değişken bölge, antijen bağlama yeri sahasının parçası olan CDR'ler ve çerçeve bölgeleri (FR'ler) içerir.

Burada "hiper değişken bölge", "HV", "tamamlayıcılık belirleme bölgesi", "CDR" ve "antikor CDR'si" terimleri alternatifli olarak kullanılmakta ve birlikte bir antikorun bir antijen bağlama yerini oluşturan her değişken bölge içindeki birçok bölümün birini belirtmektedir. Her değişken bölge sahası CDR1, CDR2 ve CDR3 adı verilen üç CDR içerir. Üç CDR, doğrusal amino asit dizisi boyunca bitişik değildir, ama katlanmış polipeptitte yakındır. CDR'ler, değişken sahanın beta yapraklarının paralel ipliklerini birleştiren ilmekler içinde bulunur.

Burada "antijen bağlama sahası", "antijen bağlama yeri", "antijen birleşme yeri" ve "antikor birleşme yeri" terimleri, bir antikor içinde soydaş antijeni tanıyan ve onunla fiziksel olarak etkileşen bir sahayı belirtmek üzere eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. Bir doğal geleneksel tam uzunlukta antikor molekülü, her biri bir ağır zincir değişken bölgesinin bölümlerini ve bir hafif zincir değişken bölgesinin bölümlerini içeren iki geleneksel antijen bağlama yerine sahiptir. Bir geleneksel antijen bağlama yeri, değişken bölge sahaları içindeki ters paralel beta ipliklerini bağlayan ilmekler içerir. Antijen birleşme yerleri değişken bölge sahalarının başka bölümlerini içerebilir. Her geleneksel antijen bağlama yeri, ağır zincirden üç hiper değişken bölge ve hafif zincirden üç hiper değişken bölge içerir. Hiper değişken bölgeler tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR'ler) olarak da adlandırılır.

Burada bir antikor ağır veya hafif zincirine veya değişken ağır veya hafif zincirine referansla "bunun bir bölümü" ifadesi, bunun, bir ağır ve hafif zincir içeren bir antikor halinde birleştirildiğinde, 6 CDR'nin hepsini içeren karşılık gelen tam uzunlukta antikorun bağlanma spesifitesinin en azından bir bölümünü korumak için yeterli olan değişken ağır (V_H) ve değişken hafif (V_L) zincirlerin 6 CDR'sinin en az 1'ini veya 2'sini, tipik olarak 3'ünü, 4'ünü, 5'ini veya 6'sını da içerecek şekilde bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bitişik bölümünü belirtmek için kullanılmaktadır. Genellikle, yeterli bir antijen bağlama yeri, ağır zincirin CDR3'ünü (CDR_H3) gerektirir. Tipik olarak ayrıca hafif zincirin CDR3'ünü (CDR_L3) gerektirir. Burada açıklandığı gibi, bu alanda uzman olanlar CDR'leri bilebilir ve Kabat veya Chothia numaralandırması temelinde belirleyebilirler (örneğin bakınız: Kabat, E.A. ve diğerleri (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Beşinci Basım, ABD Sağlık ve İnsani Hizmetler Bakanlığı, NIH Publication No. 91-3242 ve Chothia, C. ve diğerleri (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917).

Burada çerçeve bölgeleri (FR'ler) terimi, beta yaprakları içinde bulunan antikor değişken bölge sahaları içindeki sahaları belirtmek için kullanılmaktadır; FR bölgeleri, amino asit dizileri açısından, hiper değişken bölgelere göre karşılaştırmalı olarak daha korunmuştur.

Burada bir sabit bölge sahası, bir antikor ağır veya hafif zincirindeki, antikorlar arasında değişken bölge sahasından karşılaştırmalı olarak daha çok korunmuş bir amino asit dizisi içeren bir saha olarak kullanılmaktadır. Her hafif zincir tek bir hafif zincir sabit bölge (C_L) sahasına sahiptir ve her ağır zincir C_H1, C_H2, C_H3 ve C_H4'ü içeren, bir veya daha fazla ağır zincir sabit bölge (C_6) sahası içerir. Tam uzunlukta IgA, IgD ve IgG izotipleri C_H1, C_H2, C_H3 ve bir menteşe bölgesi içerir, IgE ve IgM ise C_H1, C_H2, C_H3 ve C_H4'ü içerir. C_H1 ve C_L sahaları antikor molekülünün Fab kolunu uzatır, böylece antijenle etkileşime ve antikor kollarının dönmesine katkıda bulunur. Antikor sabit bölgeleri, sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, örneğin çeşitli hücreler, biyomoleküller ve dokularla etkileşim yoluyla, antikorun spesifik olarak bağlandığı antijenler, patojenler ve toksinlerin temizlenmesi gibi efektör işlevlerini yerine getirebilir.

Burada bir monoklonal antikor gibi, başka bir antikordan elde edilen antikor fragmanlarından söz edilirken "-den elde edilen" veya "türev" ifadesi, orijinal veya ana antikorun bağlanma spesifitesini koruyan antikor fragmanlarının (örneğin Fab, F(ab'), $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları) tasarlanmasını belirtmek için kullanılmaktadır. Bu fragmanlar sınırlandırıcı olmamak koşuluyla enzimatik yarılma, kimyasal çapraz bağlama, rekombinant yollar veya bunların kombinasyonları da dâhil olmak üzere bu alanda bilinen çeşitli usullerle elde edilebilir. Genellikle, elde edilen antikor fragmanı, antikor fragmanı ve ana antikorun aynı epitopu bağlayacağı şekilde, ana antikorun özdeş veya esas itibarıyla özdeş ağır zincir değişken bölgesini (V_H) ve hafif zincir değişken bölgesini (V_L) paylaşır.

Burada bir "ana antikor" veya "kaynak antikor" terimi, bir antikor fragmanının (örneğin Fab, F(ab'), $F(ab)_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları) elde edildiği bir antikoru belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor ifadesi, bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine veya bunun çözünür bir fragmanına spesifik olarak bağlanan ve aktivitesini bloke eden veya aktivitesini inhibe eden veya azaltan herhangi bir antikoru belirtmek için kullanılmaktadır. Bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor tipik olarak bir bağışıklık sistemi kontrol noktası ligand proteinini veya bir

bağışıklık sistemi kontrol noktası reseptör proteinini bağlar ve bir reseptörün hedef bağışıklık sistemi kontrol noktası ligand proteinine veya bir ligandın hedef bağışıklık sistemi kontrol noktası reseptör proteinine bağlanmasını bloke eder, böylece bir bağışıklık yanıtını baskılayan inhibitör sinyal transdüksiyonunu önler. Dolayısıyla, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorlar, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleridir. Burada bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorlara yapılan referans, spesifik olarak bir bağışıklık sistemi kontrol noktası ligandına veya reseptör proteinine bağlanan tam uzunlukta antikorları ve bunların antijen bağlayıcı fragmanlarını kapsamaktadır. Bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı örnek antikorlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla anti-sitotoksik T-lenfositle ilişkili protein 4 (CTLA4) antikorları ve programlı hücre ölümü proteini 1'e (PD-1) karşı antikorları yer alır.

Burada bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorun antijen bağlayıcı bir fragmanı, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikordan elde edilen, ama bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorun tam uzunlukta dizisinden daha az olan, ama antikorun değişken bölgelerinin (ağır ve hafif) bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü (örneğin bir veya daha fazla CDR ve genellikle bütün CDR'ler) içeren ve dolayısıyla bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorun bağlanma spesifitesini ve/veya aktivitesini koruyan bir antikoru belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada, anti-CTLA4 antikoru terimi, sitotoksik T-lenfositle ilişkili protein 4'e (CTLA4) veya bunun çözünür bir fragmanına spesifik olarak bağlanan ve ligandların CTLA4'e bağlanmasını bloke eden, böylece CTLA4'ün rekabetçi inhibisyonuna ve T hücresi aktivasyonunun CTLA4 dolayımlı inhibisyonunun inhibisyonuna yol açan herhangi bir antikoru belirtmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla anti-CTLA4 antikorları CTLA4 inhibitörleridir. Burada anti-CTLA4 antikorlarına yapılan referans, spesifik olarak CTLA4'e bağlanan tam uzunlukta bir antikoru ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları gibi türevlerini kapsamaktadır. Örnek anti-CTLA4 antikorları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla İpilimumab veya Tremelimumab veya bunların bir türevi veya antijen bağlayıcı fragmanı yer alır.

Burada, bir sitotoksik T-lenfositle ilişkili protein 4 (CTLA4; CD152 olarak da bilinir) antijeni terimi, CD80 (B7-1 olarak da geçer) ve CD86 (B7-2 olarak da geçer) gibi

ligandlarla bağlı olan, immünoglobülin süper familyasının bir inhibitör reseptörünü belirtmek için kullanılmaktadır. CTLA4 beşeri ve beşeri olmayan proteinleri içerir. Özellikle, CTLA4 antijeni DİZİ İD NO: 10'da verilen amino asit dizisine sahip beşeri CTLA4'ü içerir (örneğin bakınız: GenBank Erişim No. AAL07473.1).

Burada, anti-PD-1 antikoru, programlı hücre ölümü proteini 1'e (PD-1) veya bunun çözünür bir fragmanına spesifik olarak bağlanan ve ligandların PD-1'e bağlanmasını bloke eden, böylece PD-1'in rekabetçi inhibisyonuna ve T hücresi aktivasyonunun PD-1 dolayımlı inhibisyonunun inhibisyonuna yol açan herhangi bir antikoru belirtmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla, anti-PD-1 antikorları PD-1 inhibitörleridir. Burada anti-PD-1 antikorlarına referans, spesifik olarak PD-1'e bağlanan tam uzunlukta bir antikoru ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları gibi türevlerini içermektedir. Örnek anti-PD-1 antikorları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Nivolumab, MK-3475, Pidilizumab veya bunların bir türevi veya antijen bağlayıcı fragmanı yer alır.

Burada bir programlı hücre ölümü proteini 1 (PD-1) antijeni terimi, bir tip 1 membran proteini olan ve B7 familyasının üyeleri olan, PD-L1 ve PD-L2 gibi ligandlarla bağlı olan bir inhibitör reseptörü belirtmek için kullanılmaktadır. PD-1 beşeri ve beşeri olmayan proteinleri içerir. Özellikle PD-1 antijeni, DİZİ İD NO: 299'da verilen amino asit dizisine sahip beşeri PD-1'i içerir (örneğin bakınız: UniProt Erişim No. Q15116.3).

Burada, anti-PD-L1 antikoru terimi, programlı hücre ölümü ligandı 1'e (PD-L1) veya bunun çözünür bir fragmanına spesifik olarak bağlanan ve ligandın PD-1'e bağlanmasını bloke eden, böylece PD-1'in rekabetçi inhibisyonuna ve T hücresi aktivitesinin PD-1 dolayımlı inhibisyonunun inhibisyonuna yol açan herhangi bir antikoru belirtmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla, anti-PD-L1 antikorları PD-1 inhibitörleridir. Burada anti-PD-L1 antikorlarına referans, spesifik olarak PD-L1'e bağlanan tam uzunlukta bir antikoru ve bunun antijen bağlayıcı fragmanları gibi türevlerini içermektedir. Örnek anti-PD-L1 antikorları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 veya bunların bir türevi veya antijen bağlayıcı fragmanı yer alır.

Burada, "bağlamak", "bağlı" veya bunun gramatik çeşitleri, bir molekülün başka bir molekülle herhangi bir çekim etkileşimine, iki molekülün birbirine çok yakın olduğu stabil bir birleşime yol açacak şekilde katılımını belirtmek için kullanılmaktadır. Bağlanma sınırlandırıcı olmamak koşuluyla kovalent olmayan bağları, kovalent bağları (tersine çevrilebilir ve tersine çevrilemez kovalent bağlar) içerir ve sınırlandırıcı olmamak

koşuluyla proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, lipitler ve küçük moleküller, örneğin ilaçlar da dâhil olmak üzere kimyasal bileşikleri arasındaki etkileşimleri kapsar. Örnek bağlar antikor-antijen etkileşimleri ve reseptör-ligand etkileşimleridir. Bir antikor belirli bir antijeni "bağladığı" zaman, bağlanma, antikor birleşme yerlerinde, soydaş antikor-antijen etkileşimi yoluyla, antijenin spesifik olarak antikor tarafından tanınmasını belirtir. Bağlanma disülfür bağları vasıtasıyla etkileşime giren antikor zincirleri gibi, bir polipeptidin birden fazla zincirinin birleşimini de içerebilir.

Burada, bağlayıcı aktivite, bir molekülün, örneğin bir polipeptidin, bir veya daha fazla bağlanma ortağını bağlayıp bağlamadığına ve nasıl bağladığına ilişkin özelliğini belirtmek için kullanılmaktadır. Bağlayıcı aktiviteler, bağlanma ortağını/ortaklarını bağlama kabiliyetini, bağlanma ortağına bağlanma afinitesini (örneğin yüksek afinite), bağlanma ortağına bağlanma aviditesini (bağlanma gücü), bağlanma ortağıyla bağın gücünü ve/veya bağlanma ortağıyla bağlanma spesifitesini içerir.

Burada "afinite" veya "bağlanma afinitesi" bağlanma ortakları gibi iki veya daha fazla molekül arasındaki etkileşimin gücünü, tipik olarak iki bağlanma ortağı arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin gücünü belirtmek için kullanılmaktadır. Bir antikorun veya bunun antijen bağlayıcı fragmanının bir antijen epitopu için afinitesi, tek bir antikor birleşme yeri ile epitop arasındaki toplam kovalent olmayan etkileşimlerin gücünün ölçüsüdür. Düşük afiniteli antikor-antijen etkileşimi zayıftır ve moleküller birbirinden hızla ayrılma eğilimindedir, yüksek afiniteli antikor-antijen bağlanması ise güçlüdür ve moleküller daha uzun bir süre bağlı kalır. Afinite hesaplaması için usuller, örneğin birleşme/ayrılma sabitlerini belirlemek için usuller iyi bilinmektedir. Örneğin yüksek bir antikor afinitesi, antikorun yaklaşık 10^6 M^{-1}'den yüksek veya buna eşit, yaklaşık 10^7 M^{-1}'den yüksek veya buna eşit, yaklaşık 10^8 M^{-1}'den yüksek veya buna eşit veya yaklaşık 10^9 M^{-1}, 10^{10} M^{-1}, 10^{11} M^{-1} veya 10^{12} M^{-1} olan bir denge birleşme sabitiyle (K_A) spesifik olarak bir hedef proteine bağlandığını belirtmektedir. Antikorlar 10^{-4} M, 10^{-6}M ila 10^{-7} M veya 10^{-8} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M veya 10^{-12} M veya daha düşük bir denge ayrılma sabitiyle de (K_D) özellik kazanabilir. Afinite ampirik olarak hesaplanabilir veya afiniteler karşılaştırmalı olarak, örneğin belirli bir antijen için bir antikorun ve başka bir antikorun afinitesi karşılaştırılarak da belirlenebilir. Örneğin bu afiniteler denge diyaliziyle olduğu gibi geleneksel teknikler kullanılarak; imalatçı tarafından açıklanan genel usullerle BIAcore 2000 aleti kullanılarak; radyoaktif işaretli hedef antijen kullanılarak radyoimmün tahlille; veya bu alanda uzman olanların bildiği başka bir usulle kolayca belirlenebilir.

Afinite verileri örneğin Scatchard ve diğerleri, Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949) usulüyle analiz edilebilir.

Burada, antikor aviditesi terimi, çok değerlikli bir antikor ve soydaş antijeni, örneğin tekrar eden epitopları veya bir epitop dizisi olan bir antijenle ilişkili birden fazla bağlanma yeri içeren antikorlar arasındaki çoklu etkileşimlerin gücünü belirtmek için kullanılmaktadır. Yüksek aviditeli bir antikorda bu etkileşimlerin gücü, düşük aviditeli bir antikorla karşılaştırıldığında daha yüksektir.

Burada "afinite sabiti", bir antikorun bir antijen için afinitesini ölçmek için kullanılan bir birleşme sabitini (Ka) belirtmek için kullanılmaktadır. Afinite sabiti ne kadar yüksekse antikorun antijen için afinitesi o kadar fazladır. Afinite sabitleri karşılıklı molarite birimleriyle (yani M^{-1}) ifade edilir ve antikor reaksiyonları için standart kinetik metodolojiyle (örneğin immünolojik tahliller, yüzey plazmon rezonansı veya bu alanda bilinen başka kinetik etkileşim tahlilleri) ölçüldüğü üzere birleşme-ayrılma reaksiyonu için hız sabitinden hesaplanabilir. Bir antikorun bağlanma afinitesi bir ayrılma sabiti veya Kd olarak da ifade edilebilir. Ayrılma sabiti birleşme sabitinin tersidir, Kd = 1/Ka. Dolayısıyla bir afinite sabiti Kd ile de ifade edilebilir.

Burada "aynı" terimi, antikor bağlanma afinitesine referansla kullanıldığında, birleşme sabitinin (Ka) veya ayrılma sabitinin (Kd) referans antikorun yaklaşık 1 ila 100 katı veya 1 ila 10 katı aralığında (referans antikora göre 1-100 kat daha fazla afinite veya 1-100 kat daha az afinite veya herhangi bir sayısal değer veya aralık veya bu aralıklar içindeki herhangi bir değer) olduğu anlamına gelir.

Burada, "esas itibarıyla" aynı ifadesi, birleşme sabitine (Ka) veya ayrılma sabitine (Kd) referansla kullanıldığında, birleşme sabitinin referans antikorun birleşme sabitinin (Ka) yaklaşık 5 ila 5000 kat daha fazlası veya daha azı içinde (referans antikordan 5-5000 kat daha fazla veya 5-5000 kat daha az) olduğunu belirtmek için kullanılır.

Burada, bir antikora veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanına ilişkin olarak "spesifik olarak bağlanma" veya "immünospesifik olarak bağlanma" ifadesi alternatifli olarak kullanılmakta ve antikorun antikor birleşme yer(ler) ile antijen arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerle, antikorun veya antijen bağlayıcı fragmanın bir soydaş antijenle bir veya daha fazla kovalent olmayan bağ oluşturma kabiliyetini belirtmektedir. Tipik olarak, immünospesifik olarak bağlanan (veya spesifik olarak bağlanan) bir antikor, bir hedefe yaklaşık veya 1×10^{7} M^{-1} veya $1x\ 10^{8}$ M^{-1} veya daha yüksek bir afinite sabitiyle (Ka) (veya

1x 10^{-7} M veya 1×10^{-8} M veya daha az olan bir ayrılma sabitiyle (K_d)) bağlanan bir antikordur. Afinite sabitleri antikor reaksiyonları için standart kinetik metodolojiyle, örneğin immünolojik tahliller, yüzey plazmon rezonansı (SPR) (Rich ve Myszka (2000) Curr. Opin. Biotechnol 11:54; Englebienne (1998) Analyst. 123:1599), izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC) veya bu alanda bilinen başka kinetik etkileşim tahlilleriyle belirlenebilir (örneğin bakınız: Paul, ed., Fundamental Immunology, 2. basım, Raven Press, New York, sayfa 332-336 (1989); antikorların bağlanma afinitesini hesaplamak için örnek SPR ve ITC usullerinin bir açıklaması için ayrıca ABD Patenti No. 7,229,619'a bakınız). Bağlanma hızlarının gerçek zamanlı olarak saptanması ve izlenmesi için araçlar ve usuller bilinmekte ve piyasada bulunmaktadır (örneğin BIAcore 2000, BIAcore AB, Upsala, İsveç ve GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (1999) Biochem. Soc. Trans. 27:335). Belirli bir antijene (örneğin EGFR) immünospesifik olarak bağlanan antikorlar veya antijen bağlayıcı fragmanlar, örneğin immünolojik tahliller, örneğin radyoimmün tahliller (RIA), enzime bağlı immünosorbent tahlilleri (ELISA'lar), yüzey plazmon rezonansı veya bu alanda uzman olanların bildiği başka tekniklerle belirlenebilir.

Burada bir bağışıklık yanıtı, lenfositler bir antijenik molekülü yabancı olarak tanımladıkları ve yabancı antijenle reaksiyona girebilen ve antijeni uzaklaştırabilen antikorların ve lenfositlerin oluşumuna yol açtıkları zaman bir hayvan tarafından üretilen bir yanıttır. Özellikle, antijenik molekül, bir tümör hücresiyle ilişkili bir antijendir ve bağışıklık yanıtı tümör hücresine yöneliktir.

Burada, güçlendirilmiş bir bağışıklık yanıtı ifadesi, bir bağışıklık yanıtıyla ilişkili aktivitedeki bir artışı belirtmek için kullanılmaktadır. Güçlendirilmiş veya arttırılmış bağışıklık aktivitesi sınırlandırıcı olmamak koşuluyla dolaşan bağışıklık hücrelerindeki (örneğin lenfositler) bir artış ve tümör antijenlerini spesifik olarak tanıyan lenfositlerdeki bir artış da dâhil olmak üzere çeşitli usullerle ölçülebilir.

Burada tümöre karşı bir bağışıklık yanıtı, spesifik olarak bir tümör hücresine veya tümör antijenine yönelik bir bağışıklık yanıtı olarak kullanılmaktadır.

Burada hiyalüronana karşı bir madde ifadesi, hiyalüronan (HA) sentezini veya ayrışmasını modüle eden, böylece bir dokudaki veya hücredeki hiyalüronan seviyelerini değiştiren herhangi bir maddeyi belirtmek için kullanılmaktadır. Buradaki amaçlar için, hiyalüronana karşı maddeler, maddenin olmadığı durumla karşılaştırıldığında bir dokudaki veya hücredeki hiyalüronan seviyelerini azaltır. Bu maddeler arasında HA sentazı (HAS) ve

hiyalüronan metabolizmasında rol oynayan başka enzimleri veya reseptörleri kodlayan genetik malzemenin ekspresyonunu modüle eden veya HAS işlevi veya aktivitesi de dâhil olmak üzere hiyalüronanı sentezleyen veya ayrıştıran proteinleri modüle eden bileşikler yer alır. Maddeler arasında küçük moleküller, nükleik asitler, peptitler, proteinler veya başka bileşikler yer alır. Örneğin, hiyalüronana karşı maddeler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla antisens veya sens moleküller, antikorlar, enzimler, küçük moleküllü inhibitörler ve HAS substratı analogları yer alır.

Burada hiyalüronan ayrıştırıcı bir enzim, bir hiyalüronan polimerinin (hiyalüronik asit veya HA olarak da geçer) daha küçük molekül ağırlıklı fragmanlar halinde yarılmasını katalize eden bir enzimi belirtmek için kullanılmaktadır. Örnek hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler hiyalüronanı depolimerize edebilen hiyalüronidazlar ve özellikle kondroitinazlar ve liyazlardır. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler olan örnek kondroitinazlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla kondroitin ABC liyaz (kondroitinaz ABC olarak da bilinir), kondroitin AC liyaz (kondroitin sülfat liyaz veya kondroitin sülfat eliminaz olarak da bilinir) ve kondroitin C liyaz yer alır. Kondroitin ABC liyaz iki enzim içerir: kondroitin-sülfat-ABC endoliyaz (EC 4.2.2.20) ve kondroitin-sülfat-ABC eksoliyaz (EC 4.2.2.21). Örnek kondroitin-sülfat-ABC endoliyazlar ve kondroitin-sülfat-ABC eksoliyazlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla *Proteus vulgaris* ve *Flavobacterium heparinum*'dan (*Proteus vulgaris* kondroitin-sülfat-ABC endoliyaz DİZİ İD NO: 253'te verilmektedir; Sato ve diğerleri (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1):39-46) elde edilenler yer alır. Bakterilerden elde edilen örnek kondroitinaz AC enzimleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, DİZİ İD NO: 254'te verilen, *Flavobacterium heparinum*'dan olanlar, DİZİ İD NO: 255'te verilen, *Victivallis vadensis*'ten olanlar ve *Arthrobacter aurescens*'ten olanlar yer alır (Tkalec ve diğerleri (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1):29-35; Ernst ve diğerleri (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5):387-444). Bakterilerden elde edilen örnek kondroitinaz C enzimleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla *Streptococcus* ve *Flavobacterium*'dan elde edilenler yer alır (Hibi ve diğerleri (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48(2):121-4; Michelacci ve diğerleri (1976) J. Biol. Chem. 251:1154-8; Tsuda ve diğerleri (1999) Eur. J. Biochem. 262:127-133).

Burada hiyalüronidazlar terimi, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin bir sınıfını belirtmek için kullanılmaktadır. Hiyalüronidazlar arasında bakteriyel hiyalüronidazlar (EC 4.2.2.1 veya EC 4.2.99.1), sülükler, başka parazitler ve kabuklulardan elde edilen hiyalüronidazlar (EC

3.2.1.36) ve memeli tipi hiyalüronidazlar (EC 3.2.1.35) yer alır. Hiyalüronidazlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla fare, köpek, kedi, tavşan, kuş, büyükbaş hayvan, küçükbaş hayvan, domuz, at, balık, kurbağa, bakteri kaynaklı olanlar ve sülükler, başka parazitler ve kabuklulardan gelenler dâhil olmak üzere beşeri olmayan herhangi bir kaynaktan gelenler yer alır. Örnek beşeri olmayan hiyalüronidazlar arasında inekler (DİZİ İD NO: 176-178 ve BH55 (ABD Patentleri No. 5,747,027 ve 5,827,721)), Avrupa eşek arısı (DİZİ İD NO: 171 ve 172), bal arısı (DİZİ İD NO: 173), white-face hornet (Dolichovespula Maculata) (DİZİ İD NO: 174), kâğıt arısı (DİZİ İD NO: 175), fare (DİZİ İD NO: 193-196), domuz (DİZİ İD NO: 191, 192), sıçan (DİZİ İD NO: 198-201), tavşan (DİZİ İD NO: 203), koyun (DİZİ İD NO: 184-187), şempanze (DİZİ İD NO: 204), Hint şebeği (DİZİ İD NO: 202), orangutan (DİZİ İD NO: 205), sinomolgus maymunu (DİZİ İD NO: 206), kobay (DİZİ İD NO: 197), *Arthrobacter* türü (suş FB24) (DİZİ İD NO: 222), *Bdellovibrio bacteriovorus* (DİZİ İD NO: 223), *Propionibacterium acnes* (DİZİ İD NO: 224), *Streptococcus agalactiae* ((DİZİ İD NO: 225); 18RS21 (DİZİ İD NO: 226); serotip Ia (DİZİ İD NO: 227); ve serotip III (DİZİ İD NO: 228)), *Staphylococcus aureus* (suş COL (DİZİ İD NO: 229); suş MRSA252 (DİZİ İD NO: 230, 231); suş MSSA476 (DİZİ İD NO: 232); suş NCTC 8325 (DİZİ İD NO: 233); suş büyükbaş hayvan RF122 (DİZİ İD NO: 234, 235); ve suş USA300 (DİZİ İD NO: 236)), *Streptococcus pneumoniae* ((DİZİ İD NO: 237); suş ATCC BAA-255 / R6 (DİZİ İD NO: 238); ve serotip 2, suş D39 / NCTC 7466 (DİZİ İD NO: 239)), *Streptococcus pyogenes* (serotip M1 (DİZİ İD NO: 240); serotip M2, suş MGAS10270 (DİZİ İD NO: 241); serotip M4, suş MGAS10750 (DİZİ İD NO: 242); serotip M6 (DİZİ İD NO: 243); serotip M12, suş MGAS2096 (DİZİ İD NO: 244, 245); serotip M12, suş MGAS9429 (DİZİ İD NO: 246); ve serotip M28 (DİZİ İD NO: 247)); *Streptococcus suis* (DİZİ İD NO: 248-250); *Vibrio fischeri*'den (suş ATCC 700601/ ES114 (DİZİ İD NO: 251)) elde edilenler ve hiyalüronik asit için spesifik olan ve kondroitin veya kondroitin sülfatı yarmayan *Streptomyces hyaluronolyticus* hiyalüronidaz enzimi (Ohya, T. ve Kaneko, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198:607) yer alır. Hiyalüronidazlar arasında beşeri kökenli olanlar da yer alır. Örnek beşeri hiyalüronidazlar arasında HYAL1 (DİZİ İD NO: 218), HYAL2 (DİZİ İD NO: 219), HYAL3 (DİZİ İD NO: 220), HYAL4 (DİZİ İD NO: 221) ve PH20 (DİZİ İD NO: 217) yer alır. Hiyalüronidazlar arasında ayrıca, küçükbaş ve büyükbaş hayvan PH20, çözünür beşeri PH20 ve çözünür rHuPH20 dâhil olmak üzere çözünür hiyalüronidazlar da yer alır. Piyasada bulunan büyükbaş veya küçükbaş hayvan çözünür hiyalüronidazlarının örnekleri arasında Vitrase® (küçükbaş hayvan

hiyalüronidaz), Amphadase® (büyükbaş hayvan hiyalüronidaz) ve Hydase™ (büyükbaş hayvan hiyalüronidaz) yer alır.

Burada, "saflaştırılmış büyükbaş hayvan testis hiyalüronidazı" terimi, büyükbaş hayvan testis ekstraktlarından saflaştırılmış bir büyükbaş hayvan hiyalüronidazı belirtmek için kullanılmaktadır (bakınız: ABD Patentleri No. 2,488,564, 2,488,565, 2,806,815, 2,808,362, 2,676,139, 2,795,529, 5,747,027 ve 5,827,721). Piyasada bulunan saflaştırılmış büyükbaş hayvan testis hiyalüronidazlarının örnekleri arasında Amphadase® ve Hydase™, ve sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Sigma Aldrich, Abnova, EMD Chemicals, GenWay Biotech, Inc., Raybiotech, Inc. ve Calzyme'den elde edilebilenler de dâhil olmak üzere büyükbaş hayvan hiyalüronidazları yer alır. Sınırlandırıcı olmamak koşuluyla DİZİ İD NO: 181-183'ün herhangi birinde verilen bir nükleik asit molekülünün ekspresyonuyla üretilenler gibi, rekombinant olarak üretilen büyükbaş hayvan hiyalüronidazları da dâhildir.

Burada "saflaştırılmış küçükbaş hayvan testis hiyalüronidazı" terimi, küçükbaş hayvan testis ekstraktlarından saflaştırılmış bir küçükbaş hayvan hiyalüronidazını belirtmek için kullanılmaktadır (bakınız: ABD Patentleri No. 2,488,564, 2,488,565 ve 2,806,815 ve Uluslararası PCT Yayını No. WO2005/118799). Piyasada bulunan saflaştırılmış küçükbaş hayvan testis ekstraktının örnekleri arasında Vitrase®, ve sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Sigma Aldrich, Cell Sciences, EMD Chemicals, GenWay Biotech, Inc., Mybiosource.com ve Raybiotech, Inc.'ten elde edilebilenler de dâhil olmak üzere küçükbaş hayvan hiyalüronidazları yer alır. Sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, DİZİ İD NO: 188-190'ın herhangi birinde verilen bir nükleik asit molekülünün ekspresyonuyla üretilenler de dâhil olmak üzere rekombinant olarak üretilen küçükbaş hayvan hiyalüronidazları da dâhildir.

Burada "PH20" terimi, spermde oluşan ve nötr-aktif olan bir hiyalüronidaz tipini belirtmek için kulanılmaktadır. PH-20 sperm yüzeyinde ve iç akrozomal membrana bağlı olduğu lizozim türevli akrozomda oluşur. PH20 sınırlandırıcı olmamak koşuluyla insan, şempanze, sinomolgus maymunu, Hint şebeği, fare, büyükbaş hayvan, küçükbaş hayvan, kobay, tavşan ve sıçan da dâhil olmak üzere herhangi bir kökenden olanları içerir. Örnek PH20 polipeptitleri arasında insandan (DİZİ İD NO: 217), şempanzeden (DİZİ İD NO: 204), Hint şebeğinden (DİZİ İD NO: 202), sinomolgus maymunundan (DİZİ İD NO: 206), inekten (örneğin DİZİ İD NO: 177, 178), fareden (DİZİ İD NO: 196), sıçandan (DİZİ İD NO:

201), tavşandan (DİZİ İD NO: 203), koyundan (DİZİ İD NO: 185-187) ve kobaydan (DİZİ İD NO: 197) elde edilenler yer alır.

Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlere referans, öncü hiyalüronan ayrıştırıcı enzim polipeptitlerini ve olgun hiyalüronan ayrıştırıcı enzim polipeptitlerini (bir sinyal dizisinin çıkarıldığı polipeptitler gibi), bunların aktiviteye sahip budanmış formlarını kapsar ve alelik varyantları ve tür varyantlarını, uç birleşme varyantları tarafından kodlanan varyantları ve başka varyantları içerir, bunlara DİZİ İD NO: 217 ve 129, 130, 171-178, 184-187, 191-206 218-255, 258, 268-272, 274, 300 ve 301'de açıklanan öncü polipeptitlere veya bunların olgun formlarına en az %40, %45, %50, %55, %65, %70, %75, %80, %85, %90, %95, %96, %97, %98, %99 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip polipeptitler dâhildir. Örneğin hiyalüronan ayrıştırıcı enzime referans ayrıca DİZİ İD NO: 179, 180'de verilen beşeri PH20 öncü polipeptit varyantlarını kapsar. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler arasında ayrıca kimyasal veya translasyon sonrası modifikasyonlar içerenler ve kimyasal veya translasyon sonrası modifikasyonlar içermeyenler de yer alır. Bu modifikasyonlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla PEGilasyon, albüminasyon, glikosilasyon, farnesilasyon, karboksilasyon, hidroksilasyon, fosforilasyon ve bu alanda bilinen başka polipeptit modifikasyonları yer alır. Bir budanmış PH20 hiyalüronidaz, herhangi bir C terminal olarak kısaltılmış formudur, özellikle budanmış ve N-glikosile olduğunda nötr aktif olan formlardır.

Burada, bir "çözünür PH20" ifadesi, fizyolojik koşullar altında çözünür olan herhangi bir PH20 formunu belirtmek için kullanılmaktadır. Bir çözünür PH20 örneğin 37°C'de sulu bir Triton® X-114 çözeltisi içine ayrılmasıyla belirlenebilir (Bordier ve diğerleri, (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7). GPI-çapalı PH20 de dâhil olmak üzere lipit-çapalı PH20 gibi membran-çapalı PH20 deterjan açısından zengin bir faza ayrılacaktır, ama Fosfolipaz-C ile işlemin ardından deterjan açısından yoksul veya sulu faza ayrılacaktır. Çözünür PH20'lere, PH20'nin membrana çapalanmasıyla ilişkili bir veya daha fazla bölgenin çıkarıldığı veya modifiye edildiği membran-çapalı PH20 yer alır, burada çözünür form hiyalüronidaz aktivitesini korur. Çözünür PH20 ayrıca rekombinant çözünür PH20'yi ve örneğin koyun veya inek testis ekstraktları gibi doğal kaynaklarda bulunanlar veya bunlardan saflaştırılanları kapsar. Böyle bir çözünür PH20'nin bir örneği çözünür beşeri PH20'dir.

Burada çözünür beşeri PH20 veya sHuPH20 terimi, ekspresyon sonucunda polipeptitlerin fizyolojik koşullar altında çözünür olacağı şekilde C terminalde glikosilfosfatidilinozitol

(GPI) çapa dizisinin tamamından veya bir bölümünden ari olan PH20 polipeptitleri kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Çözünürlük, fizyolojik koşullar altında çözünürlüğü gösteren herhangi bir uygun usulle değerlendirilebilir. Bu usullerin bir örneği, sulu faza ayrılmayı değerlendiren ve yukarıda ve örneklerde açıklanan Triton® X-114 tahlilidir. Ayrıca, bir çözünür beşeri PH20 polipeptidi, CHO-S hücreleri gibi CHO hücrelerinde üretilirse, eksprese edilen bir polipeptittir ve hücre kültürü ortamı içine salgılanır. Ancak çözünür beşeri PH20 polipeptitleri, CHO hücrelerinde üretilenlerle sınırlı olmayıp, herhangi bir hücrede veya rekombinant ekspresyon ve polipeptit sentezi de dâhil olmak üzere herhangi bir usulle üretilebilir. CHO hücreleri tarafından salgılanmaya referans tanımsaldır. Dolayısıyla bir polipeptit CHO hücreleri tarafından eksprese edilebiliyor ve salgılanabiliyorsa ve çözünürse, yani Triton® X-114'le ekstrakte edildiğinde sulu faza ayrılıyorsa, bu şekilde üretilsin veya üretilmesin çözünür bir PH20 polipeptididir. sHuPH20 polipeptitleri için öncü polipeptitler, heterolog veya heterolog olmayan (yani doğal) bir sinyal dizisi gibi bir sinyal dizisi içerebilir. Örnek öncüler, 1-35. amino asit pozisyonlarında doğal 35 amino asit sinyal dizisi gibi bir sinyal dizisi içerenlerdir (örneğin DİZİ İD NO: 217'nin 1-35. amino asitlerine bakınız). Örnek çözünür beşeri PH20 polipeptitleri arasında, DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen amino asit dizisine veya DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen bir amino asit dizisine en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip olan ve hiyalüronidaz aktivitesini koruyan bir amino asit dizisi yer alır.

Burada "çözünür rekombinant beşeri PH20 (rHuPH20)" ibaresi, Çin Hamsteri Yumurtalık (CHO) hücrelerinde rekombinant olarak eksprese edilen ve salgılanan beşeri PH20'nin çözünür formunu içeren bir bileşime referansta bulunmak için kullanılmaktadır. Çözünür rHuPH20, sinyal dizisini içeren ve DİZİ İD NO: 111'de verilen nükleik asit molekülü tarafından kodlanır. Çözünür rHuPH20'yi kodlayan nükleik asit, olgun polipeptidi salgılayan CHO hücrelerinde eksprese olur. Kültür ortamında üretildiğinde, ürünün çeşitli miktarlarda DİZİ İD NO: 123-128'in herhangi birini veya daha fazlasını içerebilen türlerin bir karışımını ihtiva edeceği şekilde C terminalde heterojenlik vardır.

Burada, "konjugat" terimi, doğrudan veya dolaylı olarak bir veya daha fazla başka polipeptide veya kimyasal kısma bağlı bir polipeptidi belirtmek için kullanılmaktadır. Bu konjugatlar arasında füzyon proteinleri, kimyasal konjugatlarla üretilenler ve başka usullerle üretilenler yer alır. Örneğin bir konjugat bir veya daha fazla başka polipeptide

veya kimyasal kısma doğrudan veya dolaylı olarak bağlı hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi, örneğin bir hiyalüronidazı veya çözünür PH20 polipeptidini belirtmektedir, burada konjugatın hiyalüronidaz aktivitesini koruması koşuluyla, en az bir çözünür PH20 polipeptidi doğrudan veya dolaylı olarak başka bir polipeptide veya kimyasal kısma bağlıdır.

Burada "polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim" ifadesi, doğrudan veya dolaylı olarak bir polimere bağlı bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi belirtmek için kullanılmaktadır. Bağlanma sınırlandırıcı olmamak koşuluyla iyonik ve kovalent bağlar ve herhangi bir başka yeterince stabil birleşme etkileşimi dâhil olmak üzere herhangi bir tip bağlanma olabilir. Örneğin polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, bir polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronidazı veya çözünür PH20 polipeptidini içerir. Polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzime referans, konjugatın hiyalüronidaz aktivitesi gösterdiği anlamına gelir. Tipik olarak, polimer-konjugat, bir polimere konjuge edilmemiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle karşılaştırıldığında en az %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90 veya daha yüksek oranda daha fazla hiyalüronidaz aktivitesi gösterir.

Burada "N ile bağlı kısım" terimi, bir polipeptidin translasyon sonrası modifikasyonuyla glikosile edilebilen bir polipeptidin bir asparagin (N) amino asit kalıntısını belirtmek için kullanılmaktadır. Beşeri PH20'nin örnek N ile bağlı kısımları arasında DİZİ İD NO: 217'de verilen beşeri PH20'nin N82, N166, N235, N254, N368 ve N393 amino asitleri yer alır.

Burada, "polimer" terimi, tekrar birimlerinden oluşan herhangi bir yüksek molekül ağırlıklı doğal veya sentetik kısmı belirtmek için kullanılmaktadır. Polimerler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla polietilen glikol kısımları, dekstran, selüloz ve siyalik asit yer alır. Bu ve başka örnek polimerler burada açıklanmakta ve birçoğu bu alanda bilinmektedir. Buradaki amaçlar için, polimer bir polipeptide konjuge edilebilir, yani doğrudan veya dolaylı olarak bir bağlayıcı vasıtasıyla kalıcı bir şekilde bağlanabilir. Bu polimer konjugatları tipik olarak serum yarılanma ömrünü arttırır ve bunlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla siyalik kısımlar, PEGilasyon kısımları, dekstran ve şeker ve başka kısımlar, örneğin glikosilasyon yer alır. Örneğin bir çözünür PH20 veya rHuPH20 gibi hiyalüronidazlar bir polimere konjuge edilebilir.

Burada "PEGillenmiş" terimi, polietilen glikol (PEGilasyon kısmı PEG) gibi polimerik moleküllerin, tipik olarak hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin yarılanma ömrünü arttırmak için, hiyalüronidazlar gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler de dâhil olmak üzere proteinlere kovalent veya başka kalıcı bağlanmasını belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada kansere karşı bir madde veya kemoteraptik bir madde terimi, kanser hücreleri gibi hızla bölünen hücreleri öldürebilen bir maddeyi belirtmek için kullanılmaktadır. Bu alanda uzman olanlar, kemoterapötik maddeler de dâhil olmak üzere kansere karşı maddelere âşinadırlar. Örnek maddeler burada açıklanmaktadır.

Burada bir ön ilaç, biyotransformasyondan sonra farmakolojik aktivite gösteren bir bileşiktir. Örneğin, gemsitabin gibi nükleozit analogları ön ilaçlar olup, deoksisitidin kinazla iki aktif metabolite – gemsitabin difosfat ve gemsitabin trifosfat – hücre içi dönüşümün bir sonucu olarak aktivite oluşur. Trifosfat (diflorodeoksisitidin trifosfat) DNA içine katılım için endojen deoksinükleozit trifosfatlarla rekabet eder.

Burada, bir ilaca referansla türev terimi, bir ilacın bir referans ilaca veya maddeye göre değişikliğe veya modifikasyona uğramış, ama referans ilaç veya maddeyle karşılaştırıldığında hâlâ aktiviteyi koruyan (örneğin artmış veya azalmış aktivite gösteren) bir formunu belirtmek için kullanılmaktadır. Tipik olarak bir bileşiğin bir türev formu, bileşiğin bir yan zincirinin modifiye edildiğini veya değiştirildiğini belirtir.

Burada, bir analog veya bir ilacın veya maddenin analoğu terimi, bir referans ilaçla ilişkili olan, ama kimyasal ve biyolojik aktiviteleri farklı olabilen bir ilacı veya maddeyi belirtmek için kullanılmaktadır. Tipik olarak, analoglar bir referans ilaca veya maddeye benzer aktiviteler gösterirler, ama aktivite artmış veya azalmış veya başka türlü gelişmiş olabilir. Tipik olarak, bir bileşiğin veya ilacın bir analog formu, yapının temel çekirdeğinin bir referans ilaca göre modifiye olduğu veya değiştiği anlamına gelir.

Burada "aktivite" terimi, bir polipeptidin veya bunun bir bölümünün, tam uzunlukta (tam) bir proteinle ilişkili bir işlevsel aktivitesini veya aktivitelerini belirtmek için kullanılmaktadır Örneğin bir polipeptidin aktif fragmanları tam uzunlukta bir proteinin bir aktivitesini gösterebilir. İşlevsel aktiviteler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla biyolojik aktivite, katalitik veya enzimatik aktivite, antijenisite (bir anti-polipeptit antikoruna bağlanma veya bağlanmak için bir polipeptitle rekabet etme kabiliyeti), immünojenisite, multimerler oluşturma kabiliyeti ve bir reseptöre, liganda veya antijene spesifik olarak bağlanma kabiliyeti yer alır.

Burada "hiyalüronidaz aktivitesi" terimi, hiyalüronik asidin yarılmasını enzimatik olarak katalize etme kabiliyetini belirtmek için kullanılmaktadır. Hiyalüronidaz için Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) XXII tahlili, hiyalüronidaz aktivitesini, enzimin 37°C'de 30 dakika HA ile reaksiyona girmeye bırakılmasından sonra kalan yüksek molekül ağırlıklı hiyalüronik asit veya hiyalüronan (HA) substratın miktarını ölçerek dolaylı olarak belirler (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, MD). Herhangi bir hiyalüronidazın nispi aktivitesini birim olarak değerlendirmek için bir tahlilde bir Referans Standart çözeltisi kullanılabilir. Çözünür PH20 ve esPH20 de dâhil olmak üzere PH20 gibi hiyalüronidazların hiyalüronidaz aktivitesini belirlemek için *in vitro* tahliller bu alanda bilinmekte ve burada açıklanmaktadır. Örnek tahliller arasında, yarılmamış hiyalüronik asit serum albüminiyle bağlandığında oluşan çözünmez çökeltiyi saptayarak hiyalüronik asidin hiyalüronidaz tarafından yarılmasını dolaylı olarak ölçen mikrotürbidite tahlili ve bir streptavidin-yabanturpu peroksidaz konjugatı ve bir kromojenik substratla mikrotitre plakası kuyucuklarına kovalent olmayan bir şekilde bağlı, kalan biyotinlenmiş-hiyalüronik asidi saptayarak hiyalüronik asidin yarılmasını dolaylı olarak ölçen biyotinlenmiş-hiyalüronik asit tahlili yer alır. Örneğin test edilen hiyalüronidazın birimleri olarak aktiviteyi belirlemek üzere bir standart eğri oluşturmak için Referans Standartlar kullanılabilir.

Burada spesifik aktivite terimi bir mg protein için aktivite birimlerini belirtmek için kullanılmaktadır. Miligram olarak hiyalüronidaz, M^{-1} cm^{-1} birimleriyle yaklaşık 1.7 olan bir molar sönüm katsayısı varsayılarak 280 nm'de bir çözeltinin emilimiyle tanımlanır.

Burada "nötr aktif" terimi, bir PH20 polipeptidinin nötr pH'de (örneğin (yaklaşık) pH 7.0'da) hiyalüronik asidin yarılmasını enzimatik olarak katalize etme kabiliyetini belirtmek için kullanılır.

Burada bir "GPI-çapası bağlanma sinyal dizisi" ifadesi, önceden oluşmuş bir GPI çapasının ER'nin lümeni içindeki polipeptide ilavesini yöneten bir C terminal amino asit dizisini belirtmek için kullanılmaktadır. GPI-çapası bağlanma sinyal dizileri, GPI-çapalı PH20 polipeptitleri gibi GPI-çapalı polipeptitlerin öncü polipeptitlerinde bulunur. C terminal GPI-çapası bağlanma sinyal dizisi tipik olarak, ω yerinin veya GPI-çapası bağlanma yerinin hemen akış aşağısında, öncesinde 8-12 amino asitlik bir hidrofilik aralama bölgesi gelen, 8-20 amino asitlik ağırlıklı olarak hidrofobik bir bölge içerir. GPI-çapası bağlanma sinyal dizileri, bu alanda iyi bilinen usuller kullanılarak belirlenebilir. Bunlar arasında

sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, ExPASy Proteomics araçları sitesi gibi biyoinformatik internet sitelerinde (örneğin World Wide Web site expasy.ch/tools/) kolayca erişilebilenler de dâhil olmak üzere bilgisayar ortamındaki usuller ve algoritmalar yer alır (örneğin bakınız: Udenfriend ve diğerleri (1995) Methods Enzymol. 250:571-582, Eisenhaber ve diğerleri, (1999) J. Biol. Chem. 292: 741-758, Fankhauser ve diğerleri, (2005) Bioinformatics 21:1846-1852, Omaetxebarria ve diğerleri, (2007) Proteomics 7:1951-1960, Pierleoni ve diğerleri, (2008) BMC Bioinformatics 9:392).

Burada "nükleik asitler" terimi, peptit nükleik asitler (PNA) ve bunların karışımları da dâhil olmak üzere DNA, RNA ve bunların analoglarını kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Nükleik asitler tek veya çift iplikli olabilir. İsteğe bağlı olarak, örneğin bir floresan veya radyoaktif işaret gibi saptanabilir bir işaretle işaretlenen problara veya primerlere referansta bulunulduğunda, tek iplikli moleküller düşünülmektedir. Bu moleküller tipik olarak, bir topluluğun araştırılması veya tetiklenmesi için hedeflerinin istatistiksel olarak benzersiz veya düşük kopya sayılı (tipik olarak 5'ten az, genellikle 3'ten az) olacağı bir uzunluktadır. Genellikle bir prob veya primer ilgilenilen bir geni tamamlayıcı veya ona özdeş olan dizinin en az 14, 16 veya 30 bitişik nükleotidini içerir. Problar ve primerler 10, 20, 30, 50, 100 veya daha fazla nükleotit uzunluğunda olabilir.

Burada bir peptit, uzunluğu 2 amino asitten fazla veya buna eşit ve uzunluğu 40 amino asitten az veya buna eşit olan bir polipeptidi belirtmektedir.

Burada, burada sunulan çeşitli amino asit dizilerinde oluşan amino asitler, bilinen üç harfli veya bir harfli kısaltmalarına göre tanımlanır (Tablo 1). Çeşitli nükleik asit fragmanlarında oluşan nükleotitler bu alanda rutin olarak kullanılan standart tek harfli adlarıyla adlandırılır.

Burada bir "amino asit", bir amino grubu ve bir karboksilik asit grubu içeren bir organik bileşik anlamında kullanılmaktadır. Bir polipeptit iki veya daha fazla amino asit içerir. Buradaki amaçlar için, amino asitler yirmi doğal olarak oluşan amino asidi, doğal olmayan amino asitleri ve amino asit analoglarını (yani α-karboniun bir yan zincire sahip olduğu amino asitler) kapsamaktadır.

Burada "amino asit kalıntısı" terimi, peptit bağlarında bir polipeptidin kimyasal sindirimi (hidroliz) üzerine oluşan bir amino asidi belirtmek için kullanılmaktadır. Burada açıklanan amino asit kalıntılarının "L" izomerik formunda olduğu varsayılmaktadır. Bu şekilde adlandırılan, "D" izomerik formundaki kalıntılar, polipeptidin istenen işlevsel özelliği

koruması koşuluyla herhangi bir L-amino asit kalıntısıyla sübstitüe edilebilir. NH2 bir polipeptidin amino terminalinde bulunan serbest amino grubunu belirtir. COOH bir polipeptidin karboksil terminalinde bulunan serbest karboksi grubunu belirtir. J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968)'de ve kabul edilen 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822'de açıklanan standart polipeptit terminolojisine uygun olarak, amino asit kalıntıları için kısaltmalar Tablo 1'de gösterilmektedir:

Tablo 1. Uyum Tablosu

SİMGE		
1 Harf	**3 Harf**	AMİNO ASİT
Y	Tyr	Tirozin
G	Gly	Glisin
F	Phe	Fenilalanin
M	Met	Metionin
A	Ala	Alanin
S	Ser	Serin
I	Ile	İzolösin
L	Leu	Lösin
T	Thr	Treonin
V	Val	Valin
P	Pro	Prolin
K	Lys	Lizin
H	His	Histidin
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamik asit
Z	Glx	Glu ve/veya Gln
W	Trp	Triptofan
R	Arg	Arginin
D	Asp	Aspartik asit
N	Asn	Asparagin
B	Asx	Asn ve/veya Asp
C	Cys	Sistein
X	Xaa	Bilinmeyen veya başka

Burada formüllerle temsil edilen bütün amino asit kalıntısı dizileri, geleneksel amino terminal-karboksil terminal yönünde soldan sağa bir yönelime sahiptir. Ayrıca, "amino asit kalıntısı" ibaresi, Uyum Tablosunda (Tablo 1) sıralanan amino asitleri ve 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822'de referansta bulunulanlar gibi modifiye edilmiş ve olağandışı amino asitleri kapsayacak şekilde tanımlanmaktadır. Ayrıca, bir amino asit kalıntısı dizisinin başındaki veya sonundaki bir tirenin, bir veya daha fazla amino asit kalıntısının başka bir dizisine, NH_2 gibi bir amino terminal gruba veya COOH gibi bir karboksil terminal gruba bir peptit bağını işaret ettiğini belirtmek gerekir.

Burada, "doğal olarak oluşan α-amino asitler" ifadesi, insanlardaki soydaş mRNA kodonuyla birlikte yüklü tRNA molekülünün spesifik olarak tanınmasıyla proteine dâhil edilen, doğada bulunan 20 α amino asidin kalıntılarını belirtmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla doğal olarak oluşmayan amino asitler arasında örneğin doğal olarak oluşan 20 amino asit dışındaki amino asitler veya amino asit analogları yer alır ve bunlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla amino asitlerin D-stereoizomerleri yer alır. Örnek doğal olmayan amino asitler burada açıklanmakta ve bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir.

Burada, bir DNA oluşumu terimi, doğada bulunmayan bir şekilde birleştirilmiş ve yan yana konmuş DNA segmentleri içeren, tek veya çift iplikli, doğrusal veya dairesel bir DNA molekülünü belirtmek için kullanılmaktadır. DNA oluşumları insan manipülasyonunun bir sonucu olarak var olurlar ve klonları ve manipüle edilmiş moleküllerin başka kopyalarını içerirler.

Burada DNA segmenti terimi, belirlenen özelliklere sahip daha büyük bir DNA molekülünün bir bölümünü belirtmek için kullanılmaktadır. Örneğin belirtilen bir polipeptidi kodlayan bir DNA segmenti, 5' → 3' yönünde okunduğunda, belirtilen polipeptidin amino asit dizisini kodlayan, bir plazmit veya plazmit fragmanı gibi, daha uzun bir DNA molekülünün bir bölümüdür.

Burada, polinükleotit terimi, 5' uçtan 3' uca doğru okunan deoksiribonükleotitler veya ribonükleotit bazlarının tek veya çift iplikli bir polimeri anlamında kullanılmaktadır. Polinükleotitler RNA ve DNA'yı içerir ve doğal kaynaklardan izole edilebilir, *in vitro* sentezlenebilir veya doğal ve sentetik moleküllerin bir kombinasyonundan hazırlanabilir. Bir polinükleotit molekülünün uzunluğu burada nükleotitler ("nt" olarak kısaltılmaktadır) veya baz çiftleri ("bp" olarak kısaltılmaktadır) olarak verilmektedir. Nükleotitler terimi,

bağlamın izin verdiği durumda tek ve çift iplikli moleküller için kullanılmaktadır. Terim çift iplikli moleküllere uygulandığında, genel uzunluğu vermek için kullanılır ve baz çiftleri terimine eşdeğer olarak anlaşılacaktır. Bu alanda uzman olanlar çift iplikli bir polinükleotidin iki ipliğinin uzunluğunun biraz farklı olabildiğini ve uçlarının kademeli olabildiğini takdir edeceklerdir; dolayısıyla çift iplikli bir polinükleotit molekülü içindeki bütün nükleotitler eşleşmiş olmayabilir. Bu eşleşmemiş uçların uzunluğu genellikle 20 nükleotidi aşmayacaktır.

Burada iki protein veya nükleik asit arasındaki "benzerlik"ten söz edildiğinde, proteinlerin amino asit dizisi veya nükleik asitlerin nükleotit dizileri arasındaki ilişkililiğe referansta bulunulmaktadır. Benzerlik kalıntı dizilerinin ve içlerinde bulunan kalıntıların özdeşlik ve/veya homoloji derecesini esas alabilir. Proteinler veya nükleik asitler arasındaki benzerlik derecesini değerlendirmek için usuller bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir. Örneğin dizi benzerliğini değerlendirmenin bir usulünde, iki amino asit veya nükleotit dizisi, diziler arasında maksimum özdeşlik seviyesi elde edilecek şekilde hizalanır. "Özdeşlik" amino asit veya nükleotit dizilerinin sabit değişmezlik derecesini belirtir. Amino asit dizilerinin ve bir ölçüye kadar nükleotit dizilerinin hizalanmasında, amino asitlerdeki (veya nükleotitlerdeki) koruyucu farklılıklar ve/veya sık sübstitüsyonlar da dikkate alınabilir. Koruyucu farklılıklar söz konusu kalıntıların fizikokimyasal özelliklerini koruyan farklılıklardır. Hizalamalar global (karşılaştırılan dizilerin, dizilerin bütün uzunluğu boyunca ve bütün kalıntıları kapsayan bir şekilde hizalanması) veya lokal (dizilerin sadece en benzer bölgeyi veya bölgeleri kapsayan bir bölümünün hizalanması) olabilir.

"Özdeşlik" kendi başına bu alanda bilinen bir anlama sahiptir ve yayımlanmış teknikler kullanılarak hesaplanabilir (Örneğin bakınız: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Kısım I, Griffin, A.M. ve Griffin, H.G., ed., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; ve Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. ve Devereux, J., ed., M Stockton Press, New York, 1991). İki polinükleotit veya polipeptit arasındaki özdeşliği ölçmek için bir dizi usul bulunmakla birlikte, "özdeşlik" terimi bu alanda uzman olanlar tarafından iyi bilinmektedir (Carrillo, H. v Lipman, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

Burada homolog terimi (nükleik asit ve/veya amino asit dizilerine referansla), yaklaşık %25'ten yüksek veya buna eşit dizi homolojisini, tipik olarak %25, %40, %50, %60, %70, %80, %85, %90 veya %95'ten yüksek veya buna eşit dizi homolojisini belirtmek için kullanılmaktadır; gerekliyse tam yüzde belirtilebilir. Buradaki amaçlar için, "homoloji" ve "özdeşlik" terimleri aksi belirtilmedikçe sıklıkla alternatifli olarak kullanılmaktadır. Genel olarak, homoloji veya özdeşlik yüzdesi belirlemesi için, diziler en yüksek seviyede uyum elde edilecek şekilde hizalanır (örneğin bakınız: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Kısım I, Griffin, A.M. ve Griffin, H.G., ed., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; ve Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. ve Devereux, J., ed., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo ve diğerleri (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Dizi homolojisiyle, korunmuş amino asitler sayısı, standart hizalama algoritması programlarıyla belirlenir ve her tedarikçi tarafından belirlenen varsayılan açıklık cezalarıyla kullanılabilir. Esas itibarıyla homolog nükleik asit molekülleri ilgilenilen nükleik asidin bütün uzunluğu boyunca tipik olarak orta zorlayıcılıkta veya yüksek zorlayıcılıkta hibridize olacaktır. Hibridize olan nükleik asit molekülünde kodonların yerine dejenere kodonlar içeren nükleik asit molekülleri de düşünülmektedir.

Herhangi iki molekülün en az %60, %70, %80, %85, %90, %95, %96, %97, %98 veya %99 "özdeş" veya "homolog" olan nükleotit dizilerine veya amino asit dizilerine sahip olup olmadığı, "FASTA" programı gibi bilinen bilgisayar algoritmalarıyla, örneğin Pearson ve diğerleri (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444'teki gibi varsayılan parametreler kullanılarak belirlenebilir (diğer programlar arasında GCG program paketi (Devereux, J. ve diğerleri, Nucleic Acids Research 12(I):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul, S.F. ve diğerleri, J Mol Biol 215:403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994 ve Carrillo ve diğerleri (1988) SIAM J Applied Math 48:1073 yer alır). Örneğin National Center for Biotechnology Information veri tabanının BLAST işlevi özdeşliği belirlemek için kullanılabilir. Diğer ticari veya kamuya açık programlar arasında DNAStar "MegAlign" programı (Madison, WI) ve Wisconsin Üniversitesi Genetics Computer Group (UWG) "Gap" program (Madison WI) yer alır. Proteinlerin ve/veya nükleik asit moleküllerinin homoloji veya özdeşlik yüzdesi, örneğin dizi bilgisi bir GAP bilgisayar programı

kullanılarak karşılaştırılmak suretiyle belirlenebilir (örneğin Needleman ve diğerleri (1970) J. Mol. Biol. 48:443, gözden geçiren Smith ve Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482). Kısaca, GAP programı benzerliği, benzer olan, hizalanmış simgelerin (yani nükleotitler veya amino asitler) sayısının, iki diziden daha kısa olandaki simgelerin toplam sayısına bölümü olarak tanımlamaktadır. GAP programı için varsayılan parametreler arasında aşağıdakiler yer alır: (1) bir tek terimli karşılaştırma matrisi (özdeşlikler için 1 değerini ve özdeş olmama durumları için 0 değerini içerir) ve Schwartz ve Dayhoff, ed., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, sayfa 353-358 (1979)'da açıklandığı gibi Gribskov ve diğerlerinin ((1986) Nucl. Acids Res. 14:6745) ağırlıklı karşılaştırma matrisi; (2) her açıklık için 3.0'lık bir ceza ve her açıklıktaki her simge için ek 0.10'luk bir ceza; ve (3) uç açıklıklar için ceza yok.

Dolayısıyla, burada "özdeşlik" veya "homoloji" terimi, bir test ve bir referans polipeptidi veya polinükleotidi arasındaki bir karşılaştırmayı belirtmek için kullanılmaktadır. Burada, en az "%90 özdeş" terimi, polipeptidin referans nükleik asit veya amino asit dizisine göre %90 ila %99.99 özdeşlikleri belirtmek için kullanılmaktadır. %90 veya daha yüksek bir seviyede özdeşlik, örnek verme amacıyla 100 amino asit uzunluğunda bir test ve referans polipeptidinin karşılaştırıldığı varsayılarak, test polipeptidindeki amino asitlerin %10'undan fazlasının (yani 100'ünden en fazla 10'unun) referans polipeptidinkinden farklı olmadığını göstermektedir. Test ve referans polinükleotitleri arasında benzer karşılaştırmalar yapılabilir. Bu farklar bir polipeptidin bütün uzunluğu boyunca rastgele dağılmış nokta mutasyonlar olarak temsil edilebilir veya bunlar izin verilebilir maksimuma kadar, örneğin 10/100 amino asit farkına (yaklaşık %90 özdeşlik) kadar değişen uzunlukta bir veya daha fazla yerde kümeleşebilir. Farklar nükleik asit veya amino asit sübstitüsyonları, eklentileri veya silintileri olarak tanımlanır. Yaklaşık %85-90'ın üzerindeki homolojiler veya özdeşlikler seviyesinde, sonuç ayarlanan program ve açıklık parametrelerinden bağımsızdır; bu yüksek özdeşlik seviyeleri kolayca, genellikle yazılımı kullanmaya gerek kalmadan manuel hizalamayla değerlendirilebilir.

Burada hizalanmış bir dizi, bir nükleotit veya amino asit dizisindeki karşılık gelen pozisyonları hizalamak için homolojinin (benzerlik ve/veya özdeşlik) kullanımını belirtmektedir. Tipik olarak, %50 veya daha fazla özdeşliğe sahip iki veya daha fazla dizi hizalanır. Bir hizalanmış diziler grubu karşılık gelen pozisyonlarda hizalanmış 2 veya daha fazla diziyi belirtir ve EST'ler gibi RNA'lardan ve genomik DNA dizisiyle hizalanmış başka cDNA'lardan elde edilen dizilerin hizalanmasını içerebilir.

Burada "primer" terimi, uygun bir tampon içinde ve uygun bir sıcaklıkta uygun koşullar altında (örneğin dört farklı nükleozit trifosfatın ve DNA polimeraz, RNA polimeraz veya ters transkriptaz gibi bir polimerizasyon maddesinin varlığında) şablon yönelimli DNA sentezinin başlangıç noktası olarak işlev görebilen bir nükleik asit molekülünü belirtmek için kullanılmaktadır. Bazı nükleik asit moleküllerinin bir "prob" olarak ve bir "primer" olarak işlev görebildiği takdir edilecektir. Ancak bir primer uzatma için bir 3' hidroksil grubuna sahiptir. Bir primer örneğin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ters transkriptaz (RT)-PCR, RNA PCR, LCR, çok katlı PCR, panhandle PCR, yakalama PCR, ekspresyon PCR, 3' ve 5' RACE, *in situ* PCR, ligasyon dolayımlı PCR ve diğer amplifikasyon protokolleri de dâhil olmak üzere çeşitli usullerde kullanılabilir.

Burada "primer çifti" terimi, amplifiye edilecek (örneğin PCR'yle) bir dizinin 5' ucuyla hibridize olan bir 5' (akış yukarı) primeri ve amplifiye edilecek dizinin 3' ucunun tamamlayıcısıyla hibridize olan bir 3' (akış aşağı) primeri içeren primerler grubunu belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada "spesifik olarak hibridize olur" ifadesi, bir nükleik asit molekülünün (örneğin bir oligonükleotit) bir hedef nükleik asit molekülüne, tamamlayıcı baz eşleştirmesiyle tavlanmasını belirtmek için kullanılmaktadır. Bu alanda uzman olanlar, spesifik molekülün uzunluğu ve bileşimi gibi, spesifik hibridizasyonu etkileyen *in vitro* ve *in vivo* parametrelere âşinadır. *İn vitro* hibridizasyonla özellikle ilişkili parametreler arasında, tavlama ve yıkama sıcaklığı, tampon bileşimi ve tuz konsantrasyonu yer alır. Spesifik olarak bağlı olmayan nükleik asit moleküllerinin çıkarılması için örnek yıkama koşulları yüksek zorlayıcılıkta 0.1 x SSPE, %0.1 SDS, 65°C ve orta zorlayıcılıkta 0.2 x SSPE, %0.1 SDS, 50°C'dir. Eşdeğer zorlayıcılık koşulları bu alanda bilinmektedir. Bu alanda uzman olanlar bu parametreleri spesifik bir uygulama için bir nükleik asit molekülünün bir hedef nükleik asit molekülüne spesifik hibridizasyonunu sağlamak üzere kolayca ayarlayabilirler. Tamamlayıcı, iki nükleotit dizisine referansla, iki nükleotit dizisinin, karşılıklı nükleotitler arasında tipik olarak %25, %15 veya %5'ten az uyumsuzlukla hibridize olabildiği anlamına gelmektedir. Gerekliyse, tamamlayıcılık yüzdesi belirtilecektir. Tipik olarak iki molekül, yüksek zorlayıcılık koşulları altında hibridize olacakları şekilde seçilir.

Burada bir ürüne esas itibarıyla özdeş ifadesi, esas itibarıyla özdeş ürünün, ürünün yerine kullanılabileceği ölçüde ilgilenilen özelliğin değişmeden kalması için yeterince benzer olma anlamında kullanılmaktadır.

Burada ayrıca “esas itibarıyla özdeş” veya “benzer” terimlerinin, ilgili alanda uzman olanların anladığı gibi bağlama göre değişecek şekilde kullanıldığı da takdir edilecektir.

Burada, bir alelik varyant veya alelik varyasyon terimi, aynı kromozomal lokusu işgal eden bir genin iki veya daha fazla alternatif formunun herhangi birini belirtmek için kullanılmaktadır. Alelik varyasyon doğal olarak mutasyonla ortaya çıkar ve popülasyonlar içinde fenotipik polimorfizmle sonuçlanabilir. Gen mutasyonları sessiz olabilir (kodlanmış polipeptitte hiçbir değişiklik yoktur) veya amino asit dizisi değişmiş polipeptitleri kodlayabilir. “Alelik varyant” terimi burada, bir genin bir alelik varyantı tarafından kodlanan bir proteini belirtmek için de kullanılmaktadır. Tipik olarak, genin referans formu bir yabani tip formu ve/veya bir popülasyondan bir polipeptidin baskın formunu veya bir türün tek referans üyesini kodlar. Tipik olarak, türler arasındaki ve içindeki varyantları içeren alelik varyantlar tipik olarak aynı türün bir yabani tipi ve/veya baskın formuyla en az %80, %90 veya daha fazla amino asit özdeşliğine sahiptir; özdeşlik yüzdesi gene ve karşılaştırmanın türler arasında veya tür içinde olmasına bağlıdır. Genel olarak, tür içi alelik varyantlar bir yabani tip ve/veya baskın formla en az yaklaşık %80, %85, %90, %95 veya daha fazla özdeşliğe sahiptir, buna bir polipeptidin bir yabani tipiyle ve/veya baskın formuyla %96, %97, %98, %99 veya daha fazla özdeşlik dâhildir. Burada bir alelik varyanta yapılan referans genellikle aynı türün üyeleri arasında proteinlerdeki varyasyonları belirtmektedir.

Burada “alelik varyant”la alternatifli olarak kullanılan “alel” terimi, bir genin veya bölümlerinin alternatif formlarını belirtmek için kullanılmaktadır. Aleller homolog kromozomlar üzerinde aynı lokusu veya pozisyonu işgal eder. Bir denekte bir genin iki özdeş aleli olduğunda, deneğin o gen veya alel izin homozigot olduğu söylenir. Bir denek bir genin iki farklı aleline sahip olduğunda, deneğin o gen için heterozigot olduğu söylenir. Spesifik bir genin alelleri birbirinden tek bir nükleotitte veya birkaç nükleotitte birbirinden farklı olabilir ve nükleotit sübstitüsyonları, silintileri ve eklentileri gibi modifikasyonlar içerebilir. Bir genin bir aleli, bir genin bir mutasyon içeren bir formu da olabilir.

Burada tür varyantları terimi, fare ve insan gibi farklı memeli türleri de dâhil olmak üzere farklı türler arasında polipeptitlerdeki varyantları belirtmek için kullanılmaktadır. Örneğin PH20 için, burada sunulan örnek tür varyantları sınırlandırıcı olmamak koşuluyla insan, şempanze, makak ve sinomolgus maymunu gibi primat PH20’leridir. Genellikle tür varyantları %70, %75, %80, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya daha

fazla dizi özdeşliğine sahiptir. Tür varyantları arasındaki ve içindeki karşılık gelen kalıntılar, diziler uyumlu nükleotitlerin veya kalıntıların sayısını en yükseğe çıkarmak üzere, örneğin diziler arasındaki özdeşlik %95'e eşit veya daha yüksek, %96'ya eşit veya daha yüksek, %97'e eşit veya daha yüksek, %98'e eşit veya daha yüksek veya %99'a eşit veya daha yüksek olacak şekilde karşılaştırılarak ve hizalanarak belirlenebilir. Daha sonra ilgilenilen pozisyona, referans nükleik asit molekülünde verilen numara verilir. Hizalama, özellikle dizi özdeşliğinin %80'in üzerinde olduğu durumda elle veya gözle yapılabilir.

Burada bir beşeri protein, alelik varyantları ve koruyucu varyasyonları da dâhil olmak üzere, bir insanın genomunda bulunan DNA gibi bir nükleik asit molekülü tarafından kodlanan bir proteindir. Bir proteinin bir varyantı veya modifikasyonu, modifikasyon bir beşeri proteinin yabani tipini veya önemli dizisini esas alıyorsa bir beşeri proteindir.

Burada bir uç birleşme varyantı, mRNA'nın birden fazla tipiyle sonuçlanan genomik DNA'nın bir birincil transkriptinin farklı işlenmesiyle üretilen bir varyantı belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada modifikasyon terimi bir polipeptidin bir amino asit dizisinin veya bir nükleik asit molekülündeki bir nükleotit dizisinin modifikasyonuna referansla kullanılmakta ve sırasıyla amino asit ve nükleotit silintilerini, eklentilerini ve ikamelerini (örneğin sübstitüsyonlar) içermektedir. Örnek modifikasyonlar amino asit sübstitüsyonlarıdır. Amino asit sübstitüsyonu olan bir polipeptit, amino asit sübstitüsyonları içermeyen bir polipeptide %65, %70, %80, %85, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya daha fazla dizi özdeşliği gösterebilir. Amino asit sübstitüsyonları koruyucu olabilir veya olmayabilir. Genellikle, bir polipeptitteki herhangi bir modifikasyon polipeptidin bir aktivitesini korur. Bir polipeptidi, örneğin rekombinant DNA metodolojilerini kullanarak modifiye etme usulleri, bu alanda uzman olanlar için rutin işlemlerdir.

Burada amino asitlerin uygun koruyucu sübstitüsyonları, bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir ve genellikle oluşan molekülün biyolojik aktivitesini değiştirmeden yapılabilir. Bu alanda uzman olanlar, genel olarak bir polipeptidin temel olmayan bölgelerindeki münferit amino asit sübstitüsyonlarının biyolojik aktiviteyi önemli ölçüde değiştirmediğini bilirler (örneğin bakınız: Watson ve diğerleri, Molecular Biology of the Gene, 4. Basım, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., sayfa 224). Bu sübstitüsyonlar aşağıda Tablo 2'de verilenlere göre yapılabilir:

Tablo 2. Koruyucu Amino Asit Sübstitüsyonları	
Orijinal Kalıntı	**Örnek koruyucu sübstitüsyon**
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Başka sübstitüsyonlara da izin verilebilir ve bunlar ampirik olarak veya bilinen koruyucu sübstitüsyonlara göre belirlenebilir.

Burada promotör terimi, bir genin, RNA polimerazın bağlanmasını ve transkripsiyonun başlatılmasını sağlayan DNA dizileri içeren bir bölümünü belirtmek için kullanılmaktadır. Promotör dizileri her zaman değil, ama genellikle genlerin 5' kodlayıcı olmayan bölgesinde bulunur.

Burada, izole edilmiş veya saflaştırılmış polipeptit veya protein veya bunun biyolojik olarak aktif bölümü, hücresel malzemeden veya proteinin elde edildiği hücre veya dokudan gelen başka kontamine edici proteinlerden esas itibarıyla aridir veya kimyasal olarak sentezlendiğinde kimyasal öncülerden veya başka kimyasallardan esas itibarıyla aridir. Terkipler, bu alanda uzman olanların saflığı değerlendirmek için kullandıkları ince tabaka kromatografisi (TLC), jel elektroforez ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi standart analiz usulleriyle belirlendiği üzere kolayca saptanabilen katışkanlardan ari görünüyorlarsa veya daha fazla saflaştırmanın maddenin enzimatik ve biolojik aktiviteler gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini saptanabilir bir şekilde değiştirmeyeceği kadar safsa bunlardan ari kabul edilebilir. Bileşiklerin kimyasal olarak esas itibarıyla saf bileşikler üretmek üzere saflaştırılmasına yönelik usuller bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir. Ancak kimyasal olarak esas itibarıyla saf bir bileşik bir stereoizomerler karışımı olabilir. Bu tür durumlarda, daha fazla saflaştırma bileşiğin spesifik aktivitesini arttırabilir.

Dolayısıyla, esas itibarıyla saflaştırılmış bir çözünür PH20 gibi esas itibarıyla saflaştırılmış bir polipeptide referans, hücresel malzemeden esas itibarıyla ari protein terkiplerini belirtmekte ve proteinin izole edildiği veya rekombinant olarak üretildiği hücrelerin hücresel bileşenlerinden ayrıldığı protein terkiplerine referansta bulunmaktadır. Bir düzenlemede, hücresel malzemeden esas itibarıyla ari terimi, yaklaşık %30'dan az (kuru ağırlıkla) enzim niteliğinde olmayan proteinler (burada kontamine edici bir protein olarak da geçer), genellikle yaklaşık %20'den az enzim niteliğinde olmayan proteinler veya %10'dan az enzim niteliğinde olmayan proteinler veya yaklaşık %5'ten az enzim niteliğinde olmayan proteinleri haiz enzim proteini terkiplerini kapsar. Enzim proteini rekombinant olarak üretildiğinde, kültür ortamından da esas itibarıyla aridir, yani kültür ortamı enzim proteini terkibinin hacminin (yaklaşık) %20, %10 veya %5'inden azını temsil eder.

Burada kimyasal öncülerden veya başka kimyasallardan esas itibarıyla ari terimi, proteinin, proteinin sentezine katılan kimyasal öncülerden veya başka kimyasallardan ayrıldığı enzim proteini terkiplerini kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Terim, kimyasal öncüleri veya enzim niteliğinde olmayan kimyasalları veya bileşenleri yaklaşık %30'dan (kuru ağırlığa göre) az, yaklaşık %20, %10, %5 veya daha düşük bir oranda içeren enzim terkiplerini kapsamaktadır.

Burada örneğin bir sentetik nükleik asit molekülüne veya bir sentetik gene veya bir sentetik peptide referansla sentetik terimi, rekombinant usullerle ve/veya kimyasal sentez usulleriyle üretilen bir nükleik asit molekülünü veya polipeptit molekülünü belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada, rekombinant yollarla veya rekombinant DNA usulleri kullanılarak üretim, klonlanmış DNA tarafından kodlanan proteinleri eksprese etmek için iyi bilinen moleküler biyoloji usullerinin kullanımını belirtmektedir.

Burada, vektör (veya plazmit) terimi, bir heterolog nükleik asidin ekspresyon veya replikasyon için hücreler içine dâhil edilmesi için kullanılan ayrı ögeleri belirtmek için kullanılmaktadır. Vektörler tipik olarak epizomal kalır, ama bir genin veya bunun bir bölümünün genomun bir kromozomu içine entegrasyonunu sağlamak için dizayn edilebilir. Maya yapay kromozomları ve memeli yapay kromozomları gibi yapay kromozomlar olan vektörler de düşünülmektedir. Bu taşıyıcıların seçimi ve kullanımı bu alanda uzman olanlar tarafından iyi bilinmektedir.

Burada, bir ekspresyon vektörü, DNA fragmanlarının ekspresyonunu sağlayabilen promotör bölgeleri gibi regülatör dizilerle işlevsel olarak bağlı, DNA'yı eksprese edebilen vektörleri kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Bu ek segmentler promotör ve sonlandırıcı diziler içerebilir ve isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla replikasyon orijini, bir veya daha fazla seçilebilir markör, bir hızlandırıcı ve bir poliadenilasyon sinyali içerebilir. Ekspresyon vektörleri genellikle plazmit veya viral DNA'dan elde edilir veya her ikisinin ögelerini içerebilir. Dolayısıyla bir ekspresyon vektörü, uygun bir konakçı hücreye dâhil edildiğinde, klonlanmış DNA'nın ekspresyonuna yol açan, bir plazmit, bir faj, rekombinant virüs veya başka vektör gibi bir rekombinant DNA veya RNA oluşumunu belirtmektedir. Uygun ekspresyon vektörleri bu alanda uzman olanlar tarafından iyi bilinmekte ve bunlar arasında ökaryotik hücrelerde ve/veya prokaryotik hücrelerde replike olabilenler ve epizomal kalanlar veya konakçı hücre genomu içine entegre olanlar yer alır.

Burada vektör terimi "virüs vektörleri"ni veya "viral vektörler"i de kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Viral vektörler, eksojen genleri hücreler içine aktarmak (taşıyıcılar veya mekikler gibi) için eksojen genlere işlevsel olarak bağlanan tasarlanmış virüslerdir.

Burada "işlevsel olarak" veya "işlevsel olarak bağlı" terimi DNA segmentlerine referansla kullanıldığında, segmentlerin hedeflenen amaçlarına uygun işlev görecekleri şekilde yerleştirildiğini belirtir, örneğin transkripsiyon promotörün akış aşağısında ve

transkripsiyondan geçirilmiş dizilerin akış yukarısında başlar. Promotör genellikle transkripsiyon mekanizmasının transkripsiyonu başlatmak için bağlandığı ve kodlama segmenti boyunca sonlandırıcıya ilerlediği sahadır.

Burada "değerlendirme" terimi, numunede bulunan bir enzim gibi bir proteinin veya bunun bir sahasının aktivitesi için mutlak bir değer elde etme anlamında ve ayrıca aktivite seviyesini gösteren bir indeks, oran, yüzde, görsel veya başka bir değer elde etme anlamında nicel ve nitel belirlemeyi kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Değerlendirme dolaysız veya dolaylı olabilir. Örneğin fiilen saptanan kimyasal türün kuşkusuz enzimatik olarak yarılmış ürünün kendisi olması gerekmez, bunun bir türevi veya başka bir madde olabilir. Örneğin bir yarılma ürününün saptanması, bir floresan kısım gibi saptanabilir bir kısım olabilir.

Burada, biyolojik aktivite terimi, bir bileşiğin *in vivo* aktivitelerini veya bir bileşiğin, bileşimin veya başka bir karışımın *in vivo* uygulanmasından kaynaklanan fizyolojik yanıtları belirtmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla biyolojik aktivite bu bileşiklerin, bileşimlerin ve karışımların terapötik etkilerini ve farmasötik aktivitesini kapsamaktadır. Biyolojik aktiviteler bu aktiviteleri test etmek veya kullanmak için dizayn edilen *in vitro* sistemlerde gözlemlenebilir. Dolayısıyla, buradaki amaçlar için, bir hiyalüronidaz enziminin bir biyolojik aktivitesi hiyalüronik asidi ayrıştırmasıdır. Bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün biyolojik aktivitesi sınırlandırıcı olmamak koşuluyla bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine bağlanma, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteininin aktivitesini inhibe veya stimüle etme, arttırılmış bir bağışıklık yanıtına yol açma ve/veya tümöre spesifik bir bağışıklık yanıtına yol açmayı içerebilir.

Burada eşdeğer terimi, iki nükleik asit dizisine referansla kullanıldığında, söz konusu iki dizinin aynı amino asit dizisini veya eşdeğer proteinleri kodladığını belirtmek için kullanılmaktadır. Eşdeğer terimi iki proteine veya peptide referansla kullanıldığında, iki proteinin veya peptidin, sadece proteinin veya peptidin aktivitesini veya işlevini önemli ölçüde değiştirmeyen amino asit sübstitüsyonlarıyla aynı amino asit dizisine sahip olduğunu belirtmektedir. Eşdeğer bir özelliğe referansla kullanıldığında, özelliğin aynı derecede bulunması gerekmez (iki peptit aynı tip enzimatik aktivitenin farklı hızlarını gösterebilir), ama aktiviteler genellikle esas itibarıyla aynıdır.

Burada "modüle etme" ve "modülasyon" veya "değiştirme" terimleri, bir protein gibi bir molekülün bir aktivitesindeki bir değişikliği belirtmek için kullanılmaktadır. Örnek

aktiviteler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla sinyal transdüksiyonu gibi biyolojik aktiviteler yer alır. Modülasyon aktivitedeki bir artışı (yani yukarı regülasyon veya agonist aktivite), aktivitedeki bir azalmayı (yani aşağı regülasyon veya inhibisyon) veya aktivitedeki herhangi bir başka değişikliği (dönemsellik, sıklık, süre, kinetik veya başka bir parametredeki bir değişiklik gibi) içerebilir. Modülasyon bağlama bağlı olabilir ve tipik olarak modülasyon belirlenmiş bir durumla, örneğin yabani tip proteinle, yapısal bir durumdaki proteinle veya belirlenmiş bir hücre tipinde veya koşulda eksprese edilen proteinle karşılaştırılır.

Burada, doğrudan uygulama ifadesi, seyreltilmeden uygulanan bir bileşimi belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada, tek dozaj formülasyonu terimi, sadece bir kez kullanıma yönelik bir formülasyonu belirtmek için kullanılmaktadır. Tipik olarak tek dozaj formülasyonu doğrudan uygulama içindir.

Burada çoklu dozaj formülasyonu terimi, tekrar uygulamalarında kullanıma yönelik bir formülasyonu belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada bileşim terimi herhangi bir karışımı belirtmek için kullanılmaktadır. Bir çözelti, süspansiyon, sıvı, toz, macun, sulu, susuz veya bunların herhangi bir kombinasyonu olabilir.

Burada kombinasyon terimi, iki veya daha fazla öge arasındaki herhangi bir birleşmeyi belirtmek için kullanılmaktadır. Kombinasyon iki veya daha fazla ögeyi, örneğin iki bileşimi veya iki derlemeyi içerebilir, bunların bir karışımı, örneğin iki veya daha fazla ögenin tek bir karışımı veya bunların herhangi bir varyasyonu olabilir. Bir kombinasyonun ögeleri genellikle işlevsel olarak birleşik veya ilişkilidir.

Burada "hastalık veya rahatsızlık" terimi, bir organizmada sınırlandırıcı olmamak koşuluyla enfeksiyonlar, edinilmiş rahatsızlıklar, genetik rahatsızlıkları kapsayan nedenlerden veya durumdan kaynaklanan ve tanımlanabilir semptomlarla özellik kazanan patolojik bir durumu belirtmek için kullanılmaktadır. Burada ilgilenilen hastalıklar ve rahatsızlıklar hiyalüronanla ilişkili hastalıklar ve rahatsızlıklardır.

Burada "intravenöz uygulama" terimi, bir terapötik maddenin doğrudan bir damar içine tatbikini belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada "hiyalüronanla ilişkili kanser" veya "hiyalüronan açısından zengin kanserler" terimi, hastalık veya rahatsızlıkta neden olarak, sonuç olarak veya başka türlü gözlemlendiği üzere hiyalüronan seviyelerinin yükseldiği kanserleri kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Hiyalüronanla ilişkili kanserler veya tümörler, bir doku veya hücrede yükselen hiyalüronan seviyeleri, artan interstisyel sıvı basıncı, azalan damar hacmi ve/veya bir dokuda artan su içeriğiyle ilişkilidir. Bu kanserler arasında katı tümörler gibi tümörler, örneğin geç evre kanserler, metastatik kanserler, başkalaşım göstermeyen kanserler, yumurtalık kanseri, in situ karsinom (ISC), skuamöz hücreli karsinom (SCC), prostat kanseri, pankreas kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri ve başka kanserler yer alır.

Burada, hiyalüronan (HA; hiyalüronik asit veya hiyalüronat olarak da bilinir) terimi tekrarlanan N-asetilglukozamin disakarit birimleri ve D-glukuronik asidin doğal olarak oluşan bir polimerini belirtmek için kullanılmaktadır. Hiyalüronan bazı tümörler tarafından üretilir.

Burada yükselmiş hiyalüronan seviyeleri, hastalığa veya rahatsızlığa, hastalıkta gözlemlenen sonuca veya başka durumlara bağlı olarak, spesifik doku, vücut sıvısı veya hücredeki hiyalüronan miktarlarına referansla kullanılmaktadır. Örneğin hiyalüronan açısından zengin bir tümörün varlığının bir sonucu olarak, kan, idrar, tükürük ve serum gibi vücut sıvılarında ve/veya tümörlü doku veya hücrede hiyalüronan (HA) seviyeleri yükselebilir. Seviye, HA'yla ilişkili hastalığı olmayan bir denekten alınan karşılaştırılabilir bir numune gibi, standart veya başka türlü uygun bir kontrolle karşılaştırılabilir.

Burada, bir HA skoru terimi, tümörlerin hücre membranları ve stroması üzerinde HA pozitif seviyelerinin yarı nicel bir skorunu belirtmek için kullanılmaktadır. Skor, formalinle fikse edilmiş ve parafinde bloklanmış doku gibi, tümör dokusundaki HA'nın, hiyalüronan bağlayıcı bir protein (HAB) (hiyaladherinler olarak da geçer) kullanımıyla HA için immünohistokimya veya psödo immünohistokimya usulleri gibi histokimya usulleriyle saptanmasıyla belirlenebilir. Hücreler ve stromadaki boyanma derecesi, bir mikroskop altında görsel olarak veya var olan bilgisayar algoritma programları ve yazılımıyla belirlenebilir. Örneğin görüntüler HA boyanması için bir piksel sayım algoritması kullanılarak nicel olarak analiz edilebilir (örneğin Aperio Spectrum Yazılımı ve boyanma derecesini ölçen veya nicel veya yarı nicel olarak belirleyen başka standart usuller). Böyle bir örnekte, güçlü pozitif boyanmanın (kahverengi boyanma gibi) toplam boyalı alana

oranı hesaplanabilir ve skor belirlenebilir, güçlü pozitif boyanmanın toplam boyanmaya oranı %25'in üzerindeyse tümör dokusu skoru HA^{+3}'tür, güçlü pozitif boyanmanın toplam boyanmaya oranı %10-25 ise tümör dokusu skoru HA^{+2}'dir, güçlü pozitif boyanmanın toplam boyanmaya oranı %10'un altındaysa tümör dokusu skoru HA^{+1}'dir ve güçlü pozitif boyanmanın toplam boyanmaya oranı 0 ise tümör dokusu skoru 0'dır. Aperio usulünün yanı sıra bu usule yönelik yazılım bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir (örneğin bakınız: ABD Patenti No. 8,023,714; ABD Patenti No.7,257,268). Bir tümör, tümör kesitinin %25'inden fazlasında güçlü HA boyanması varsa $HA^{Yüksek}$ (HA^{3+}) olarak; tümör kesitinin %10 ile %25'i arasında güçlü HA boyanması varsa HA^{Orta} (HA^{2+}) olarak; ve tümör kesitinin %10'undan azında güçlü HA boyanması varsa $HA^{Düşük}$ (HA^{+1}) olarak derecelendirilir veya puanlanır.

Burada "orta HA" bir doku veya vücut sıvısı numunesindeki HA miktarına veya seviyesine referansla kullanıldığında, normal veya sağlıklı bir doku veya vücut sıvısı numunesiyle karşılaştırıldığında doku veya vücut sıvısı numunesindeki HA derecesini veya seviyesini belirtir. Miktar karşılık gelen normal, kontrol veya sağlıklı dokudaki HA miktarının veya seviyesinin yaklaşık 1.3 katı ila 2 katı veya daha yüksekse HA miktarı ortadır. HA miktarının katı faz bağlanma tahlilleri veya histokimya gibi usuller kullanılarak belirlenebileceği ve nicel veya yarı nicel olarak ölçülebileceği takdir edilecektir. Örneğin, miktar plazma seviyelerinin karşılaştırılmasını veya histokimya ile belirlendiği üzere boyanma yoğunluğunun (örneğin pozitif pikseller yüzdesi) karşılaştırılmasını esas alabilir. Örneğin, histokimya veya başka usulle HA skoru HA^{2+} ise ve/veya tümör kesitinin %10-25'inde HA boyanması varsa orta HA vardır. Örneğin güçlü pozitif boyanmanın (kahverengi boyanma gibi) toplam boyanmış alana oranı, güçlü pozitif boyanmanın tümör dokusunun toplam boyanmasına göre oranı %25'in üzerindeyse orta HA vardır.

Burada "yüksek HA" bir doku veya vücut sıvısı numunesindeki HA miktarına veya seviyesine referansla kullanıldığında, normal veya sağlıklı bir doku veya vücut sıvısı numunesiyle karşılaştırıldığında doku veya vücut sıvısı numunesindeki HA derecesini veya seviyesini belirtir. Miktar karşılık gelen normal, kontrol veya sağlıklı dokudaki HA miktarının veya seviyesinin en az veya en az yaklaşık 2.5 katı, 3 katı, 4 katı, 5 katı, 6 katı, 7 katı, 8 katı, 9 katı, 10 katı, 20 katı, 30 katı, 40 katı, 50 katı, 60 katı, 70 katı veya daha yüksekse HA miktarı yüksektir. HA miktarının katı faz bağlanma tahlilleri veya histokimya gibi usuller kullanılarak belirlenebileceği ve nicel veya yarı nicel olarak ölçülebileceği takdir edilecektir. Örneğin, miktar plazma seviyelerinin karşılaştırılmasını

veya histokimya ile belirlendiği üzere boyanma yoğunluğunun (örneğin pozitif pikseller yüzdesi) karşılaştırılmasını esas alabilir. Örneğin, histokimya veya başka usulle HA skoru HA^{3+} ise ve/veya tümör kesitinin %25'inden fazlasında HA boyanması varsa yüksek HA vardır. Örneğin güçlü pozitif boyanmanın (kahverengi boyanma gibi) toplam boyanmış alana oranı, güçlü pozitif boyanmanın tümör dokusunun toplam boyanmasına oranı %25'in üzerindeyse yüksek HA vardır.

Burada "hiyalüronan bağlayıcı protein" (HA bağlayıcı protein; HABP veya hiyaladherin) terimi, HA'nın saptanmasına izin vermek üzere spesifik olarak HA'ya bağlanan herhangi bir proteini belirtmek için kullanılmaktadır. Bağlanma afinitesi, en az yaklaşık veya en az $10^7\ M^{-1}$ olan bir birleşme sabiti Ka'ya sahip bağlanma afinitesidir. HA bağlayıcı protein rekombinant olarak üretilmiş veya sentetik protein(ler) olabilir veya biyolojik bir kaynaktan veya fizyolojik bir kaynaktan, örneğin kıkırdaktan elde edilen bir protein olabilir. HA bağlayıcı proteinler, saptanmasına imkân vermek üzere spesifik olarak HA'ya bağlanan HA'ya bağlanan bağlama modülleri ve bunların yeterli bölümleri de dâhil olmak üzere HA bağlayıcı sahalar içerir. Dolayısıyla, HABS'lar, spesifik olarak HA'ya bağlanan hiyalüronan bağlayıcı bir bölge veya saha veya bunun yeterli bir bölümünü içeren herhangi bir proteini içerir. Örnek hiyalüronan bağlayıcı bölgeler bağlantı modülleri (bağlantı sahaları) veya G1 sahalarıdır. Yeterli bir bölüm bir bağlayıcı sahanın veya bağlantı modülünün en az 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 veya daha fazla bitişik amino asidini içerir. HA bağlayıcı proteinler ayrıca, bir HA bağlayıcı protein ve multimerizasyon sahaları da dâhil olmak üzere bir veya daha fazla ek polipeptit ihtiva eden füzyon proteinlerini de içerir. Örnek HA bağlayıcı proteinler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, HA bağlayıcı sahalar ve bunların HA'ya bağlanan bağlantı modüllerini içeren polipeptitler de dâhil olmak üzere agrekan, versikan, nörokan, brevikan, fosfakan, TSG-6, TSG-6 mutantları, örneğin burada sunulanlar yer alır.

Burada "hiyalüronan bağlayıcı saha" veya "HA bağlayıcı saha" terimi, bir HABP polipeptidinin, en az yaklaşık veya en az $10^6\ M^{-1}$ veya $10^7\ M^{-1}$ veya daha yüksek bir birleşme sabitine (Ka) veya 10^{-6} M'den az veya 10^{-7} M veya daha düşük bir ayrılma sabitine (Kd) sahip bir bağlanma afinitesiyle spesifik olarak hiyalüronana bağlanan bir bölgesini veya sahasını belirtmek için kullanılmaktadır. Örnek hiyalüronan bağlayıcı sahalar arasında örneğin bağlantı modülleri (burada bağlantı sahaları olarak da geçmektedir) veya GI sahaları veya bir bağlantı modülünün veya G1 sahasının spesifik olarak HA'ya bağlanan yeterli bölümleri yer alır.

Burada hiyalüronan bağlayıcı bir proteine referansla "multimer" terimi, birden fazla HA bağlama yeri, örneğin en az 2, 3 veya 4 HA bağlama yeri içeren bir HABP'yi belirtmek için kullanılmaktadır. Örneğin, bir HABP multimeri, her biri HA'ya bağlanabilen en az 2 bağlantı modülü içeren bir HABP'yi belirtmektedir. Örneğin, bir multimer iki veya daha fazla bağlantı modülü (örneğin TSG-6 bağlantı modülü) doğrudan veya dolaylı olarak bağlanarak üretilebilir. Bağlanma bir Fc proteini gibi bir multimerizasyon sahası kullanılarak kolaylaştırılabilir.

Burada bir "multimerizasyon sahası" terimi, bir polipeptit molekülünün, ilk sahayla stabil bir multimer oluşturmak üzere aynı veya farklı bir multimerizasyon sahası olabilen tamamlayıcı bir multimerizasyon sahası içeren başka bir polipeptit molekülüyle stabil bir etkileşimini destekleyen bir amino asit dizisini belirtmek için kullanılmaktadır. Genel olarak bir polipeptit multimerizasyon sahasıyla doğrudan veya dolaylı olarak birleşir. Örnek multimerizasyon sahaları arasında, immünoglobülin dizileri veya bunların bölümleri, lösin fermuarları, hidrofobik bölgeler, hidrofilik bölgeler, sınırlandırıcı olmamak koşuluyla PKA'nin bir R alt birimi ve bir çapa sahası (AD) dâhil olmak üzere uyumlu protein-protein etkileşim sahaları, iki molekül arasında moleküller arası bir disülfür bağı oluşturan bir serbest tiol ve bir oyuk içine şişlik (yani delik içine düğme) ve stabil multimerler oluşturan aynı veya benzer büyüklükte dengeleyici bir oyuk yer alır. Multimerizasyon sahası örneğin bir immünoglobülin sabit bölgesi olabilir. İmmünoglobülin dizisi Fc sahası veya bunun IgG1, IgG2, IgG3 veya IgG4 alttiplerinden bölümleri, IgA, IgE, IgD ve IgM gibi bir immünoglobülin sabit sahası olabilir.

Burada "Fc" veya "Fc bölgesi" veya "Fc sahası" terimi, ilk sabit bölge immünoglobülin sahası haricinde bir antikor ağır zincirinin sabit bölgesini içeren bir polipeptidi belirtmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla Fc IgA, IgD ve IgE'nin son iki sabit bölge immünoglobülin sahasını veya IgE ve IgM'nin son üç sabit bölge immünoglobülin sahasını belirtmektedir. İsteğe bağlı olarak, bir Fc sahası bu sahalara N-terminal esnek menteşenin tamamını veya bir kısmını içerebilir. IgA ve IgM için, Fc, J zincirini içerebilir. IgG'nin örnek bir Fc sahası immünoglobülin sahaları Cγ2 ve Cγ3'ü ve isteğe bağlı olarak Cγ1 ve Cγ2 arasındaki menteşenin tamamını veya bir kısmını içerir. Fc bölgesinin sınırları değişebilir, ama tipik olarak menteşe bölgesinin en azından bir kısmını içerir. Ayrıca, Fc herhangi bir alelik veya tür varyantını veya herhangi bir varyant veya modifiye edilmiş formu, örneğin bir FcR'ye bağlanmayı değiştiren veya Fc dolayımlı bir efektör işlevini

değiştiren herhangi bir varyant veya modifeye edilmiş formu da içerir. Modifiye Fc sahaları da dâhil olmak üzere diğer Fc sahalarının örnek dizileri bilinmektedir.

Burada, normal seviyeler veya değerler, bu alanda uzman olanların bildiği çeşitli yollarla tanımlanabilir. Tipik olarak, normal seviyeler sağlıklı bir popülasyonda bir HA'nın ekspresyon seviyelerini belirtir. Normal seviyeler (veya referans seviyeler) sağlıklı deneklerin, örneğin belirli bir kaynaktan (yani kan, serum, doku veya başka kaynak) alınan numunelerin ölçümünü esas alır. Genellikle normal bir seviye tipik olarak sağlıklı popülasyonun medyan %95'i olan değerler aralığını belirten bir "normal aralık" olarak belirtilecektir. Referans değer burada normal seviyeyle alternatifli olarak kullanılmaktadır, ama deneğe veya kaynağa bağlı olarak normal seviyelerden farklı olabilir. Referans seviyeler tipik olarak popülasyonun belirli bir segmentinin normal seviyelerini esas alır. Dolayısıyla, buradaki amaçlar için, bir normal veya referans seviye, test edilecek bir hastanın karşılaştırıldığı önceden belirlenmiş bir standart veya kontroldür.

Burada "yüksek seviye" ifadesi, belirtilen veya normal bir eşiğin üzerindeki herhangi bir HA miktarı veya ekspresyonu seviyesini belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada, "biyolojik numune" terimi, canlı veya viral bir kaynaktan veya başka bir makromoleküller ve biyomoleküller kaynağından elde edilen herhangi bir numuneyi belirtmek için kullanılmaktadır ve nükleik asidin veya proteinin veya başka makromolekülün elde edilebildiği bir denğin herhangi bir hücre tipini veya dokusunu içerir. Biyolojik numune doğrudan bir biyolojik kaynaktan elde edilen bir numune veya işlemden geçirilmiş bir numune olabilir. Örneğin amplifiye edilen izole edilmiş nükleik asitler biyolojik bir numune oluşturur. Biyolojik numuneler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla kan, plazma, serum, beyin-omurilik sıvısı, eklem sıvısı, idrar ve ter gibi vücut sıvıları, biyopsiyle alınmış tümör numuneleri de dâhil olmak üzere hayvanlardan alınan doku ve organ numuneleri yer alır.

Burada "saptama" terimi, bir proteinin görselleştirilmesine (gözle veya ekipmanla) izin veren usulleri içerecek şekilde kullanılmaktadır. Bir protein, proteine spesifik bir antikor kullanılarak görselleştirilebilir. Bir proteinin saptanması, bir epitop etiketi veya işareti de dâhil olmak üzere bir proteinin bir etiketle füzyonuyla da kolaylaştırılabilir.

Burada bir hastalığı veya rahatsızlığı olan bir hastanın "tedavi edilmesi" ifadesi, tedavinin ardından hastanın semptomlarının kısmen veya tamamen hafiflediğini veya sabit kaldığını belirtmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla tedavi profilaksi, terapi ve/veya iyileştirmeyi

kapsamaktadır. Profilaksi, potansiyel bir hastalığın önlenmesini ve/veya bir hastalığın semptomlarının kötüleşmesinin veya ilerlemesinin önlenmesini belirtir.

Burada "farmasötik olarak etkili madde" terimi, sınırlandırıcı olmamak koşuluyla kemoterapötikler, anestetikler, vazokonstriktörler, dağıtıcı maddeler, geleneksel terapötik ilaçlar, örneğin küçük moleküllü ilaçlar ve terapötik proteinler de dâhil olmak üzere herhangi bir terapötik maddeyi veya biyoaktif maddeleri kapsayacak şekilde kullanılmaktadır.

Burada "tedavi" terimi, bir hastalığın, rahatsızlığın veya başka endikasyonun semptomlarının iyileştiği veya başka türlü olumlu bir şekilde değiştiği herhangi bir yolu belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada, "terapötik etki" terimi, bir hastanın tedavisinden kaynaklanan, tipik olarak bir hastalığın veya rahatsızlığın semptomlarını düzelten veya iyileştiren veya bir hastalığı veya rahatsızlığı iyileştiren bir etki anlamında kullanılmaktadır. Terapötik olarak etkili bir miktar, bir bileşimin, molekülün veya bileşiğin, bir hastaya uygulandıktan sonra terapötik bir etkiyle sonuçlanan miktarını belirtmektedir.

Burada "denek" terimi bir insan gibi bir memeli de dâhil olmak üzere bir hayvanı belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada "hasta" terimi, bir hastalığın veya rahatsızlığın semptomlarını gösteren hasta bir insanı belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada "yaklaşık aynı" ifadesi, bu alanda uzman olanların aynı veya kabul edilebilir bir hata aralığı içinde kabul edeceği bir miktar aralığı içinde anlamında kullanılmaktadır. Örneğin tipik olarak farmasötik bileşimler için en az %1, %2, %3, %4, %5 veya %10'un içi yaklaşık aynı kabul edilir. Bu miktar, deneklerin spesifik bileşim içindeki değişikliğe toleranslarına göre değişebilir.

Burada "dozaj rejimi" terimi, maddenin, örneğin bir anti-hiyalüronan madde, örneğin bir çözünür hiyalüronidaz veya başka madde içeren bileşimin uygulanan miktarını ve uygulama sıklığını belirtmek için kullanılmaktadır. Dozaj rejimi, tedavi edilecek hastalığın veya rahatsızlığın bir fonksiyonudur ve dolayısıyla değişebilir.

Burada uygulama "sıklığı" terimi, ardışık tedavi uygulamaları arasındaki süreyi belirtmek için kullanılmaktadır. Örneğin sıklık günler, haftalar veya aylar olabilir. Örneğin sıklık haftada birden fazla, örneğin haftada iki, haftada üç, haftada dört, haftada beş, haftada altı

veya günlük olabilir. Sıklık bir, iki, üç veya dört haftada bir de olabilir. Spesifik sıklık tedavi edilen hastalığın veya rahatsızlığın bir fonksiyonu olabilir. Genellikle sıklık haftada birden fazladır ve genellikle haftada ikidir.

Burada "uygulama döngüsü" terimi, ardışık uygulamalarda tekrarlanan enzimin ve/veya ikinci bir maddenin uygulanmasının dozaj rejiminin tekrarlanan programını belirtmek için kullanılmaktadır. Örneğin örnek bir uygulama döngüsü, üç hafta boyunca haftada iki kez, ardından bir hafta dozajın kesilmesiyle 28 günlük bir döngüdür.

Burada, dozaj mg/kg deneğin ağırlığı esas alınarak verildiğinde, ortalama bir hasta insanın yaklaşık 70 kg-75 kg, örneğin 70 kg bir kütleye ve 1.73 m^2 bir vücut yüzey alanına (BSA) sahip olduğu kabul edilir.

Burada belirli bir hastalığın veya rahatsızlığın semptomlarının bir tedaviyle, örneğin farmasötik bir bileşimin veya başka bir terapötik maddenin uygulanmasıyla iyileştirilmesi, bir rahatsızlığın semptomlarında veya olumsuz etkilerinde kalıcı veya geçici herhangi bir azalmayı, örneğin bir PEGillenmiş bir hiyalüronidaz gibi bir anti-hiyalüronan maddenin uygulanmasıyla ilişkili veya uygulanması üzerine ortaya çıkan olumsuz etkilerin azalmasını belirtmektedir.

Burada "önleme" veya "profilaksi" terimi, bir hastalığın veya rahatsızlığın ortaya çıkma riskindeki bir azalmayı belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada "terapötik olarak etkili miktar" veya "terapötik olarak etkili doz" terimi, bir maddenin, bileşiğin, malzemenin veya bir bileşiği içeren bileşimin en azından terapötik bir etki yaratmak için yeterli miktarını belirtmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla, bir hastalığın veya rahatsızlığın bir semptomunu önlemek, iyileştirmek, düzeltmek, durdurmak veya kısmen durdurmak için gerekli olan miktardır.

Burada "birim dozaj formu" terimi , hasta insanlar ve hayvanlar için uygun ve bu alanda bilindiği gibi tek tek ambalajlanmış fiziksel olarak ayrı birimleri belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada tek dozaj formülasyonu terimi, tek bir doz olarak bir formülasyonu belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada, doğrudan uygulamaya yönelik formülasyon terimi, bileşimin uygulama için daha fazla seyreltmeyi gerektirmediği anlamında kullanılmaktadır.

Burada "imalat ürünü" terimi yapılan ve satılan bir ürünü belirtmek için kullanılmaktadır. Bu başvurunun her yerinde bu terim, ambalaj ürünleri içinde bulunan anti-hiyalüronan maddeleri, örneğin hiyalüronidaz gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bileşimlerini belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada "akışkan" terimi, akabilen herhangi bir bileşimi belirtmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla akışkanlar yarı katılar, macunlar, çözeltiler, sulu karışımlar, jeller, losyonlar, kremler ve bu tür başka bileşimler formundaki bileşimleri kapsamaktadır.

Burada "kit" terimi, sınırlandırıcı olmamak koşuluyla sulandırma, aktivasyon, tatbik aletleri/araçları, uygulama, tanı ve bir biyolojik aktivite veya özelliğin değerlendirilmesi de dâhil olmak üzere bir amaç için buradaki bileşimler ile başka bir maddenin bir kombinasyonu gibi bir bileşenler kombinasyonunu belirtmek için kullanılmaktadır. Kitler isteğe bağlı olarak kullanım talimatlarını içerebilir.

Burada bir hücre ekstraktı veya lizatı, lize edilmiş veya parçalanmış bir hücreden yapılan bir terkibi veya fraksiyonu belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada periferal kan bir toplardamardan ve/veya atardamardan alınabilen kan anlamında kullanılmaktadır. Periferal kan bir tümör gibi ilgilenilen bir bölgeye distal veya proksimal olarak alınabilir.

Burada hayvan terimi, sınırlandırıcı olmamak koşuluyla insanlar, goriller ve maymunlar da dâhil olmak üzere primatlar; fareler ve sıçanlar gibi kemirgenler; tavuklar gibi kümes hayvanları; keçiler, inekler, geyikler, koyunlar gibi geviş getirenler; domuzlar ve başka hayvanlar da dâhil olmak üzere herhangi bir hayvanı belirtecek şekilde kullanılmaktadır. İnsan dışı hayvanlar, düşünülen hayvan olarak insanları dışarıda bırakmaktadır. Burada sunulan hiyalüronidazlar hayvan, bitki, prokaryotik ve fungal herhangi bir kaynaktandır. Hiyalüronidazların çoğu memeli de dâhil olmak üzere hayvan kökenlidir. Genel olarak hiyalüronidazlar beşeri kökenlidir.

Burada kansere karşı tedaviler terimi, kanseri tedavi etmeye yönelik ilaçların ve başka maddelerin uygulanmasını ve ayrıca cerrahi ve radyasyon gibi tedavi protokollerini içerecek şekilde kullanılmaktadır. Kansere karşı tedaviler arasında kansere karşı maddelerin uygulanması yer alır.

Burada kansere karşı madde terimi, kanser tedavisinde kullanılan maddeleri veya bileşikleri belirtmek için kullanılmaktadır. Bunlar arasında tek başına veya başka

bileşiklerle kombinasyon halinde kullanıldığında tümörlerle ve kanserle ilişkili klinik semptomları veya tanı markörlerini hafifletebilen, azaltabilen, iyileştirebilen, önleyebilen veya bir gerileme durumuna getirebilen veya gerileme durumunda tutabilen ve burada sunulan kombinasyonlarda ve bileşimlerde kullanılabilen maddeler yer alır. Örnek kansere karşı maddeler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, tek başına veya kemoterapötik maddeler, polipeptitler, antikorlar, peptitler, küçük moleküller veya gen terapisi vektörleri, virüsler veya DNA gibi başka kansere karşı maddelerle kombinasyon halinde kullanılan, burada sunulan PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler yer alır.

Burada, kontrol terimi, bir test parametresiyle tedavi edilmemesi dışında test numunesine esas itibarıyla özdeş bir numuneyi belirtmek için kullanılmaktadır veya bir plazma numunesiyse, ilgilenilen hastalıktan mustarip olmayan normal bir gönüllüden alınmış olabilir. Bir kontrol bir iç kontrol de olabilir.

Burada bağlam açıkça tersini gerektirmiyorsa tekil formlar çoğul referansları da kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Dolayısıyla örneğin "bir hücre dışı saha" içeren bir bileşiğe yapılan referans, bir veya birçok hücre dışı saha içeren bileşikleri kapsamaktadır.

Burada aralıklar ve miktarlar "yaklaşık" bir belirli değer veya aralık olarak ifade edilebilir. Yaklaşık, tam miktarı da içerir. Dolayısıyla "yaklaşık 5 baz", "yaklaşık 5 baz"ı ve ayrıca "5 baz"ı içerir.

Burada "isteğe bağlı" veya "isteğe bağlı olarak" ifadesi, daha sonra açıklanan olayın veya durumun oluştuğu veya oluşmadığı ve açıklamanın sözü edilen olayın veya durumun oluşturuğu durumları ve oluşmadığı durumları kapsadığı anlamında kullanılmaktadır. Örneğin, isteğe bağlı olarak sübstitüe edilmiş bir grup, grubun sübstitüe edilmemiş veya sübstitüe edilmiş olduğu anlamındadır.

Burada herhangi bir koruyucu grup, amino asit ve başka bileşik için kısaltmalar, aksi belirtilmedikçe yaygın kullanıma, kabul edilmiş kısaltmalara veya IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature'a (bakınız: (1972) Biochem. 11:1726) uygun olarak kullanılmaktadır.

B. Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörü ve Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzim Kombinasyon Terapisi

Burada kanserlerin tedavisinde kullanım için, bir anti-hiyalüronan madde, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin bir PH20 gibi bir çözünür hiyalüronidaz) ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini bloke ederek bağışıklık yanıtını arttıran bir madde (yani bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü) içeren buradaki istemlere uygun kombinasyon terapileri sunulmaktadır. Bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin PH20 gibi bir çözünür hiyalüronidaz) olan anti-hiyalüronan madde, plazmada artmış bir yarılanma ömrü göstermek üzere modifiye veya formüle veya temin edilir. Genel olarak, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bir polimere konjugasyonla modifiye edilir. Burada açıklandığı gibi, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim sürekli salım veya lokal salım için veya kendisini kodlayan bir vektör içinde olduğu tatbik için formüle edilebilir.

Örneğin burada kanserlerin tedavisinde kullanım için kombinasyon terapileri sunulmaktadır. Kombinasyonlar polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, yani PEGPH20 gibi bir hiyalüronidaz ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini bloke ederek bağışıklık yanıtını arttıran bir madde (yani bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü) içerir. Burada sunulan kombinasyon terapilerinde, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine yönelik bir antikor, yani sitotoksik T-lenfosit antijen 4'e (CTLA-4 veya CD152) veya programlı hücre ölümü ligandı-1 (PDL-1) veya programlı hücre ölümü proteini 1'e (PD-1) karşı bir antikordur.

Özellikle, burada sunulan kombinasyon terapisi, en azından orta ila yüksek hiyalüronan (HA) fenotipine sahip katı tümörlerle ve ayrıca stromal katı tümörlerle özellik kazanan kanserlerin herhangi birinin tedavisinde kullanılır. Örnek kanserler arasında katı tümörlü kanserler, örneğin sınırlandırıcı olmamak koşuluyla pankreas kanseri, meme kanseri, skuamöz hücreli akciğer kanseri (NSCLC) gibi akciğer kanseri, prostat kanseri, mide kanseri, kolon kanseri, yumurtalık kanseri, baş ve boyun kanseri ve diğerleri yer alır. Kombinasyon terapisi, başka bir sitotoksik kemoterapötik ilacı veya radyonüklit terapisini veya ameliyatı, örneğin cerrahi rezeksiyonu da içerebilir.

1. Katı Tümörler ve Bağışıklık Yanıtı

Birçok kanser, tümöre karşı bağışıklık yanıtından kurtulmak için mekanizmalar geliştirir. Bu mekanizmalar tümör hücrelerine özgü olabilir veya mekanizmalara başka hücreler

aracılık edebilir. Tümör hücrelerine özgü mekanizmalar, bağışıklık yanıtlarına yol açan antijenlerin ekspresyon kaybını içerir. Örneğin, işleyen bir konakçı bağışıklık sisteminin varlığında, tümör hücrelerinin yüksek mitotik hızı ve genetik değişkenliği, tümörlerin büyümesi veya transforme olmuş fenotipin idamesi için gerekli olmayan tümör antijenlerini kodlayan genlerin mutasyonlarının veya silintilerinin seçilmesine yol açabilir. Örneğin bazı tümör hücreleri, T hücresi yanıtları için gerekli olan CD80 ve CD86 gibi kostimülatörleri veya yardımcı T hücrelerinin aktivasyonu için gerekli olan sınıf II majör histokompatibilite kompleksi (MHC) moleküllerini eksprese etmez. Tümör hücreleri, antijenleri elimine ederek veya bağışıklık sisteminin ativasyonu için gerekli olan ligandların ekspresyonunu önleyerek T hücresi dolayımlı bağışıklık yanıtlarından kurtulabilir.

Tümör hücreleri ayrıca, lenfositlerin ve makrofajların proliferasyonunu ve efektör işlevlerini inhibe edebilen, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) gibi immünosüpresif sitokinlerin salgılanmasıyla tümöre karşı yanıtları baskılayabilir.

Tümörler, bağışıklık sistemi hücrelerinin tümör antijenlerine erişimini inhibe ederek de bağışıklık yanıtından kaçınabilir. Örneğin tümör antijenleri, tümör hücre yüzeyi üzerinde, siyalik asit içeren mukopolisakaritler gibi glikokaliks moleküllerinin ekspresyonuyla bağıışıklık sisteminden gizlenebilir. Ayrıca tümörler, örneğin katı tümörler bir hücre dışı matris ve damar ağıyla çevrelenen kanser hücreleri ve stroma hücrelerinden (örneğin fibroblastlar ve enflamatuvar hücreler) oluşur. Stromal hücreler, hücre dışı matris bileşenleri ve/veya damar düzeni, genellikle normal dokularda bulunanlara kıyasla anormaldir. Örneğin birçok katı tümörde fibroblastların sayısı normal dokulara göre yüksektir. Ayrıca, katı tümörlerdeki damar düzeni, normal damar düzeniyle karşılaştırıldığında dallanmış veya kıvrılmış bir yapı gösterebilir ve genişlemiş damarlar, endotelyal kaplamada azalma ve/veya sıkışmış damarlarla özellik kazanan yapısal anormallikler gösterir. Son olarak, tümör ve stroma hücreleri, yoğun bir kütle oluşturan ve yüksek tümör interstisyel basıncına katkıda bulunabilen kolajenler, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar (örneğin hiyalüronan) ve başka moleküller gibi hücre dışı matris bileşenlerinin kompleks bir ağını üretir ve biraraya getirir. Terminal küçük atardamarlar ve kılcal damarlardaki damar içi basıncın üzerindeki yüksek interstisyel akışkan basıncı, akışkanların ve çözünmüş maddelerin interstisyum içine perfüzyonunu bozabilir ve tümörü infiltre eden lenfositler gibi bağışıklık yanıtı hücrelerinin tümör yüzeyine erişmesini önleyebilir.

2. Tümörlerde T hücresi aktivitesinin bağışıklık sistemi kontrol noktası modülasyonu

Normal fizyolojik koşullar altında, T hücresi dolayımlı bağışıklık yanıtı T hücresi reseptörü (TCR) tarafından antijenin tanınmasıyla başlar ve kostimülatör ve inhibitör sinyallerin (yani bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinleri) bir dengesiyle regüle edilir. Bağışıklık sistemi, otoimmüniteyi (yani kendi kendine tolerans) önlemek ve bir bağışıklık yanıtı sırasında, örneğin bir patojenik enfeksiyona karşı bir saldırı sırasında dokuları aşırı hasardan korumak için bağışıklık sistemi kontrol noktalarına dayanır. Ancak bazı durumlarda, bağışıklık sisteminden kaçmak için bir mekanizma olarak tümörlerde bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinleri bozulabilir.

Kanseri tedavi etmek için terapiler, immünosüpresif sinyalleri inhibe eden veya immünostimülan sinyalleri arttıran immünoterapileri (örneğin inhibitör kontrol noktası proteini antagonistleri veya agonistleri) içerir. Bu terapiler doğrudan tümörün kendisini hedeflemek yerine, tümörle mücadele etmek için konakçının endojen savunmalarını kullanır. Örneğin kostimülatör reseptörlerin inhibitör kontrol noktası proteini antagonistleri ve/veya agonistleri, antijene spesifik T hücresi yanıtlarını arttırarak konakçının endojen tümöre karşı bağışıklık yanıtını stimüle edebilir. Konakçının bağışıklık yanıtının güçlendirilmesi, etkilerin, hastada tedavinin kesilmesinden sonra aylarca, hatta yıllarca devam edebilen, tümöre karşı sürekli bir yanıt geliştirebilecek şekilde uzun süre kalıcı olması açısından sitotoksik terapilere göre avantajlıdır.

Özel örneklerde, burada sunulan kombinasyon terapilerinde bir inhibitör kontrol noktası proteinini hedefleyen bir madde (yani antikor) kullanılır. İnhibitör bağışıklık sistemi kontrol noktası hedef proteinleri ve hedefler için terapötik antikorlar Tablo 3'te verilmektedir.

Tablo 3. Örnek inhibitör bağışıklık sistemi kontrol noktası hedef proteinleri ve inhibitörler			
Hedef	**Hedef İşlev**	**Antikor/füzyon proteini**	**Eşanlamlılar ve Kod Adları**
CTLA4	İnhibitör reseptör	İpilimumab Tremelimumab	(MDX-CTLA-4; BMS-734016; MDX-010) (tisilimumab; CP-675,206)
PD-1	İnhibitör reseptör	MK-3475 AMP-224 Nivolumab Pidilizumab	(Pembrolizumab; Lambrolizumab; SCH 900475) (anti-PD-1 füzyon proteini AMP-224) (BMS-936558; MDX-1106; ONO-4538) (CT-011)
PD-L1	PD-1 için ligand	MDX-1105 BMS-936559 MED14736 MPDL33280A	(RG7446)

Özellikle, burada sunulan kombinasyonlar ve usuller için immünolojik inhibitör moleküller CTLA4 ve PD-1'in inhibitörleri düşünülmektedir. CTLA4 ve PD-1 negatif regülatörler olarak işlev görmekle birlikte, her biri bağışıklık yanıtlarının modülasyonunda gereksiz olmayan bir rol oynar: CTLA-4 naif ve bellek (dingin) T hücrelerinin erken aktivasyonunun azaltılmasında rol oynar; PD-1 ise periferal dokularda T hücresi aktivitesinin modülasyonunda bir rol oynar (örneğin bakınız: Keir ve diğerleri (2008) Annu Rev Immunol. 26:677-704; Pardoll, (2012) Nat Rev Cancer. 12(4):252-264; Quezada ve diğerleri, (2013) Br J Cancer. 108(8):1560-1565; Callahan ve diğerleri, (2010) Semin Oncol. 37(5):473-84). Bu aktiviteler ve tümör immünoterapisinde bu hedeflerin inhibisyonu aşağıda daha ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

a. CTLA-4 ve T hücresi tetikleme (priming)

T hücresi dolayımlı bağışıklık, antijene spesifik T hücrelerinin klonal seçimiyle başlatılan ve seçilmiş T hücrelerinin lenfoid dokularda aktivasyonu ve proliferasyonu ile devam eden tetikleme, aktive olmuş T hücrelerinin antijen ve enflamasyon alanlarına gitmesi (trafficking) ve hedef hücrelerde direkt efektör işlevlerinin uygulanması aşamalarını içerir. Bu aşamaların her biri bağışıklık yanıtı büyüklüğünün ince ayarını yapan stimülatör ve inhibitör sinyaller dengelenerek regüle edilir.

Art arda, antijene spesifik T hücrelerinin seçilmesi ve seçilmiş T hücrelerinin aktivasyonu ve proliferasyonu aşamalarını içeren T hücresi tetiklenmesi lenf düğümlerinde olur. Naif ve dingin T hücreleri, hücre yüzeyinde T hücresi reseptörünü (TCR) ve kostimülatör reseptör CD8'in yüksek seviyelerini eksprese eder. TCR'ler bir dendritik hücre veya makrofaj gibi, bir antijen sunucu hücrenin (APC) yüzeyi üzerindeki majör histokompatibilite kompleksi (MHC) moleküllerine bağlı antijen peptitlerini bağlar. APC'ler ayrıca CD28 için ligandlar olan CD80 (B7.1 olarak da adlandırılır) veya CD86'yı da (B7.2 olarak da adlandırılır) eksprese eder. TCR'nin peptidi MHC antijenini bağlaması ve T hücresi üzerinde eksprese olan kostimülatör T hücresi reseptörü CD28 tarafından CD80 veya CD86'nın tanınması üzerine, T hücresi içinde T hücresi aktivasyonunu başlatmak için sinyal transdüksiyonu olur.

Sitotoksik T lenfositle ilişkili antijen 4 (CTLA4; CD152 olarak da adlandırılır), naif veya dingin T hücrelerinin sitoplazmasında tutulan veziküller içinde paketlenen bir koinhibitör reseptördür. CD28'in başlattığı sinyal transdüksiyonu T hücresi aktivasyonunu başlattığında, CTLA4 içeren veziküllerin T hücresinin yüzeyine taşınmasını da tetikler.

CTLA4, APC üzerinde CD80 ve CD86'yı bağlamak için CDR28'le rekabet eder ve CTLA4'ün antijenler için bağlama afinitesi CD28'inkinden yüksektir. CTLA4'ün inhibitör aktivitesi, stimülatör CD28 sinyalinin büyüklüğünü azaltma etkisi yapar. Dolayısıyla, T hücresi aktivasyonu ve proliferasyonu, CD28 sinyallerinin (stimülatör) CTLA4 sinyallerine (inhibitör) oranına bağlıdır. Bu rolde, CTLA4 T hücresi aktivitesini azaltma işlevi görür ve böylece otoimmüniteyi sınırlandırır. CTLA4 yardımcı T hücresi aktivitesinin aşağı modülasyonunda ve regülatör T (T_{reg}) hücresi aktivitesinin arttırılmasında da bir rol oynar.

Tümörlerin kökü, tümör hücrelerinin tümör antijenleri için spesifik sitotoksik T lenfositler (CTL) tarafından öldürülmesiyle kazınabilir. CD4+ T yardımcı hücreleri de, antijene spesifik efektör hücreleri aktive ederek ve makrofajlar gibi, doğal bağışıklık sistemi hücrelerini tümörde toplayarak tümörlere karşı bağışıklık yanıtında bir rol oynayabilir. Ancak tümörlerin çoğu bağışıklık sisteminden kaçabilir. Bu, tümörlerin bağışıklık sistemi tarafından tanınabilen antijenler eksprese edememesiyle gerçekleşebilir. Ayrıca birçok tümör anormal bir şekilde kostimülatör ve inhibitör moleküller eksprese edebilir, böylece her şey hesaba katıldığında, CTL'lerin ve yardımcı T hücrelerinin aktivasyonu azalır. Örneğin, tümörler düşük seviyelerde CD80 veya CD86 kostimülatör molekülü eksprese edebilir, böylece stimülatör reseptör CD28'ten çok tercihli olarak inhibitör reseptör CTLA-4'ün katılımı söz konusu olur. Ayrıca, bazı tümörler regülatör T hücrelerini uyarabilir, bu da tümöre karşı bağışıklık yanıtlarını baskılar.

CTLA4'ün, örneğin anti-CTLA4 antikorları uygulamasıyla inhibisyonu, CTL'lerin aktivitesini arttırarak, efektör ve yardımcı T hücrelerinin varlığını arttırarak ve/veya T_{reg} hücrelerinin baskılayıcı işlevlerini inhibe ederek bağışıklık yanıtını arttırabilir. CTLA4'ün inhibisyonu bağışıklık yanıtının tetiklenme fazı sırasında T hücrelerinin tam aktivasyonuna izin verir.

Yukarıdaki Tablo 3'te sıralandığı gibi, CTLA4'ü bloke eden iki antikor – İpilimumab ve Tremelimumab – melanom, pankreas kanseri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri, renal hücreli kanser (RCC), kolorektal kanser (CRC), mide kanseri ve NSCLC gibi bazı kanserlerin etkili tedavisinde kullanılmıştır (bir inceleme için bakınız: Kyi ve diğerleri, (2014) FEBS Letters 588:368-376). Terapötik CTLA4 blokajı tedavinin tamamlanmasından sonra aylarca ve yıllarca tümör gerilemesi sağlayabilir (Prieto ve diğerleri, (2012) Clin Cancer Res. 18(7):2039-2047; Kirkwood ve diğerleri, (2010) Clin

Cancer Res. 16(3):1042-1048), ama aynı zamanda başka konakçı dokularına toleransı azaltarak bağışıklık sistemiyle ilişkili olumsuz olaylar (irAE'ler) gibi olumsuz olaylara yol açar.

b. PD-1 ve T Hücresi Efektör Fazı

Lenf düğümündeki aktivasyonun ardından, aktive olmuş T hücreleri kan akımına girer ve T hücresi efektör işlevlerini yerine getirmek için periferal dokulara gider. T hücresi aktivasyonunu inhibe eden bir reseptör olan programlı hücre ölümü proteini 1 (PD-1) ekspresyonu, T hücresi aktivasyonu üzerine uyarılır. PD-1 regülatör T (T_{reg}) hücreleri, tükenmiş T hücreleri, aktive olmuş B hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler, dendritik hücreler (DC'ler) ve aktive olmuş monositler üzerinde de bulunur.

PD-1 iki ana liganda sahiptir: PD-1 ligand 1 (PD-L1; B7-H1 veya CD274 olarak da adlandırılır) ve PD-L2 (B7-DC veya CD273) olarak da adlandırılır. Dokulardaki enflamatuvar sinyaller PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonunu uyarır. Ligandlarından birine bağlandığında PD-1, T hücresi reseptörü (TCR) sinyallerini inhibe ederek, immünostimülatör sitokinlerin salgılanmasını ve hayatta kalım proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak regüle etmek ve immünosüpresif sitokin IL-10'un T hücresi üretimini arttırmak suretiyle T hücresi aktivitesini zayıflatır. Bu aktiviteler, yandaki doku hasarını sınırlandırmaya ve normal koşullar altında bir bağışıklık yanıtı sırasında otoimmüniteyi sınırlandırmaya yarar.

Çok sayıda tümör ve üroteliyal yumurtalık, meme, rahim ağzı, kolon, pankreas, mide kanseri, melanom, gliyoblastom ve NSCL kanserleri gibi kanserlerin tümör mikroortamındaki hücreler PD-L1 ve/veya PD-L2 eksprese eder (Zou ve Chen, (2008) Nat. Rev. Immunol. 8(6):467-477; Rozali ve diğerleri, (2012) Clin Dev Immunol. 2012: 656340). PD-1 tümör hücreleri üzerinde ligandına bağlandığında, T hücresi aktivitesi zayıflar, bu tümör reddini önler ve dolayısıyla tümörün bağışıklık sisteminden kaçmasına katkıda bulunur. PD-L1'in tümörler tarafından ekspresyonu çeşitli kanserlerde kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Hamid ve Carvajal, (2013) Expert Opin Biol Ther. 13(6):847-861).

PD-1 sinyal yolunun bloke edilmesi, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve interferon gama (IPNγ), interlökin-2 (IL-2) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) gibi immünostimülatör sitokinlerin salgılanması gibi tümöre spesifik T hücresi efektör işlevleri gibi T hücresi efektör işlevlerinin düzelmesiyle sonuçlanır. Yukarıda Tablo 3'te verilenler gibi

monoklonal antikorların kullanıldığı terapiler dâhil olmak üzere terapiler, tümöre karşı bağışıklık yanıtını arttırmak için bir strateji olarak PD-1 ve PD-L1 veya PD-L2 arasındaki etkileşimi bloke etmek için kullanılabilir. PD-1 sinyallerini bozan anti-PD-1 antikorları arasında Nivolumab, MK-3745 ve Pidilizumab yer alır.

c. Başka İmmünomodülatör Maddeler

Başka bağışıklık sistemi kontrol noktası ligandları ve reseptörleri bağışıklık yanıtının modülasyonuna katılırlar ve tümöre karşı bağışıklığı arttırmayı amaçlayan terapilerin hedefleri olabilirler. Ayrıca, koordineli olarak eksprese olan iki veya daha fazla reseptörün veya ligandın blokajı, aditif veya sinerjistik tümöre karşı aktiviteler üretebilir.

Hedefler arasında, tümör hücrelerinde veya tümörü infiltre eden hücrelerde yukarı doğru regüle olan B7-H3 ve B7-H4 gibi, PD-L1 ve PD-L2 dışındaki B7 inhibitör ligandları yer alır. Lenfosit aktivitesinin inhibisyonuyla ilişkili olan başka hedefler arasında lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG3; CD223 olarak da adlandırılır), 2B4 (CD244 olarak da adlandırılır), B ve T lenfosit zayıflatıcı (BTLA; veya CD272), T hücresi membran proteini 3 (TIM3; veya HAVcr2), Adenozin A2a reseptörü (A2aR) ve öldürücü inhibitör reseptörler familyası yer alır. Bu, bağışıklık sistemi kontrol noktası reseptörlerinin birçoğu efektör T hücrelerinin ve T_{reg} hücrelerinin aktivitesini regüle eder. Örneğin LAG3, immünosüpresif aktiviteyi arttırmak için önemli olduğunun düşünüldüğü T_{reg} hücreleri (otoimmünitenin önlenmesine yardım ederler) üzerinde yüksek seviyede eksprese olur. LAG3 ayrıca efektör T hücresi aktivitesinin inhibisyonuyla da ilişkilidir ve T hücresi anerjisine yol açabilir (Pardoll, (2012) Nat Rev Cancer. 12(4):252-264. Bu proteinlerin tek başlarına veya kombinasyon halinde antikor tarafından hedeflenmesi, hayvan kanser modellerinde tümöre karşı bağışıklığı arttırabilmektedir. Birçok tümör hücresi birden fazla inhibitör ligand eksprese ettiği ve tümörü infiltre eden lenfositler birden fazla inhibitör reseptör eksprese ettiği için, bu proteinleri inhibe etmek için birleşimsel bir yaklaşım tümöre karşı bağışıklığın arttırılmasında etkili olabilir (bir inceleme için bakınız: Pardoll, (2012) Nat Rev Cancer. 12(4):252-264).

Salgılanan veya membrana bağlı inhibitör ligandlara ek olarak, yaygın bir şekilde tümörleri infiltre eden inhibitör miyeloid türevli baskılayıcı hücreler tarafından eksprese edilen indolemain 2,3 dioksijenaz (IDO) ve arginaz gibi metabolik enzimler, T hücrelerinin anabolik metabolizması için elzem olan amino asitleri tüketerek bağışıklık yanıtlarını lokal olarak inhibe edebilir. Bu enzimler küçük moleküllü ilaçlarla inhibe edilebilir.

3. Bir Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörüyle Kombinasyon Terapisinde Polimere Konjuge Edilmiş Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzim

Hiyalüronan (HA) katı tümörlerin hücre dışı matrisinin bir ana bileşenidir. HA tekrar eden disakarit birimleri, β-1,3 N-asetil-D-glukazaminle bağlı β-1,4 ila D-glukuronik asit içeren yüksek molekül ağırlıklı bir doğrusal glikozaminoglikandır. HA vücutta doğal olarak oluşur ve pankreas kanseri, akciğer kanseri (örneğin NSCL) ve meme kanseri hücreleri dâhil olmak üzere bazı kanser hücrelerinde aşırı yüksek seviyelerde salgılanır. Birçok katı tümör habasetinde HA metabolizmasının lokal anormallikleri bildirilmiş olup, burada yüksek HA seviyeleri sıklıkla meme kanseri, mide kanseri, kolorektal kanser, yumurtalık, prostat ve akciğer karsinomu gibi tümörlerde kötü prognozla ilişkilidir. Özellikle HA, tümörler gibi hastalıklı dokularda artan su alımında ve interstisyel akışkan basıncında (IFP) rol oynayarak, basınçlı tümör damar düzenine yol açar. Örneğin, enflamasyon yerlerinde veya bir tümör odağında, hiyalüronan, başka matris bileşenleri ve suyun hızlı birikimi söz konusudur. Bu hızlı birikim nedeniyle, hastalıklı yer ortamıyla dengeye gelemez ve dolayısıyla normal dokulardan daha yüksek bir IFP'ye sahiptir.

Yukarıda açıklandığı, katı tümörlerin çoğunun ve birikmiş HA'yla ilişkili başka hastalıklı dokuların IFP'si yüksek olup, etkili ilaç tatbikinin önünde bir bariyer oluşturmaktadır (Heldin ve diğerleri (2004) Nat Rev Cancer 4(10):806-813). HA birikimi tümör hücreleri arasındaki ve içindeki temas inhibisyonunu da azaltır (örneğin bakınız: Itano ve diğerleri (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:3609-3614). Tümör türevli hiyalüronan fiziksel bir bariyer yaratmanın yanı sıra, monositlerin geçici erken aktivasyonuyla immünosüpresif makrofajları da uyarabilir (Kuang ve diğerleri, (2007) Blood 110(2):587-595), böylece tümör hücrelerinin bağışıklık yanıtından kaçmasına izin verir ve tümör ilerlemesi için koşulları yaratır.

Hiyalüronidaz enzimleri gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, hiyalüronik aside müdahale eden ve onu ayrıştıran enzimlerdir. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, örneğin hiyalüronidazlar (örneğin PH20), doku sönecek, kan damarları genişleyecek ve bölgeye daha fazla kan akabilecek şekilde hiyalüronanı azaltabilir. Bu, doku bölgesinde interstisyel akışkan basıncının azalmasıyla ve vasküler perfüzyonda ilişkili bir artışla sonuçlanır. Ayrıca, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler (örneğin çözünür hiyalüronidaz, örneğin PH20) HA'yı ayrıştırarak kanser hücrelerini çevreleyen stromayı tüketebilir. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler (örneğin çözünür hiyalüronidaz, örneğin PH20) tek tedavili terapide

veya başka maddelerle kombinasyon terapisinde tümörlerin ve kanserlerin tedavisi için kullanılmıştır (örneğin bakınız: ABD yayımlanmış başvuru No. US2006/0104968 ve US20100003238; ve Uluslararası Yayımlanmış PCT Başvurusu No WO 2009/128917).

Tümörlerin tedavisi genellikle sistemik uygulamayı gerektirir. Bir PH20 enzimi gibi hiyalüronidazın bir sistemik tedavi olarak kullanımının, enzimin kısa yarılanma ömrüyle ilişkili problemleri vardır. Örneğin, modifiye edilmemiş hiyalüronazın kandaki enzimatik aktivitenin dakikalarla ölçülen kısa bir yarılanma ömrü vardır, genellikle 5 dakikadan kısadır. Bu, bu enzimlerin genellikle intravenöz uygulamalarda ve etki sürelerinin kısa ömürlü olduğu başka uygulamalarda kullanım için uygun olmadığı anamına gelir. Bunun nedeni ayrışmadan sonra HA substratının yaklaşık 5 saatlik bir yarılanma ömrüyle ikame edilmesidir. Buna karşılık tatbiki arttıran ve/veya bir hiyalüronidazın hücreyle ilişkili hiyalüronanla (örneğin tümörle ilişkili periselüler hiyalüronan) birleşimini uzatan usuller, HA açısından zengin tümörlerin (örneğin $HA^{yüksek}$ tümörler) tedavisine izin verir. Bu usuller arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla enzimin bir polimere konjugasyonu, aglikosile veya glikosilasyonu azaltmak için modifiye edilmiş bir enzimin kullanımı, enzimin sürekli infüzyonu ve/veya enzimin lokalize tatbiki yer alabilir. Örneğin, PEGilasyonla olduğu gibi hiyalüronidazın polimerle modifikasyonu enzimin yarılanma ömrünü yaklaşık 48 ila 72 saate çıkarır ve HA açısından zengin tümörlerin sistemik tedavisine izin verir (örneğin bakınız: ABD yayımmlanmış başvuru No. 20100003238 ve Uluslararası yayımlanmış PCT Başvurusu No. WO 2009/128917). Modifiye edilmemiş hiyalüronidaza göre artan yarılanma ömrü HA'nın uzaklaştırılmasının sürdürülmesine izin verir ve böylece tümör gibi hastalıklı dokular içinde HA'nın rejenerasyonunu azaltır veya rejenerasyon derecesini düşürür. Dolayısıyla, polimer konjugasyonuyla plazma enzim seviyelerinin korunması, HA'yı, örneğin tümör HA'sını uzaklaştırabilir ve ayrıca HA yeniden sentezine karşı koyar.

Burada, polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş çözünür hiyalüronidaz (örneğin PEGPH20) gibi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün kombinasyon terapisinin, maddelerin tek tek kullanılmasına göre tümörlerin (özellikle $HA^{yüksek}$ tümörler) tedavisi için etkinlikte önemli bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle, enzim hastaya bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün uygulanmasından önce uygulandığında bu sonuçlar belirgindir.

Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri bağışıklık yanıtlarını güçlendirmek için bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde etki yaptığı için, hiyalüronan ayrıştırıcı bir enzimle, örneğin polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle kombinasyon halinde uygulandığında artan yanıt bağışıklık hücrelerinin (örneğin CTL'ler) tümöre erişiminin artması üzerindeki etkilere bağlı olabilir. Örneğin yukarıda açıklandığı gibi tümör ve stroma hücreleri kolajenler, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar (örneğin hiyalüronan) ve lenfositlerin ve başka bağışıklık sistemi hücrelerinin infiltrasyonunu inhibe edebilen yoğun bir kütle oluşturan başka moleküller gibi hücre dışı matris bileşenlerinin kompleks bir ağını üretir ve birleştirir. Hiyalüronanın ayrışmasıyla, dolaşan bağışıklık sistemi hücrelerinin tümörler içine erişimi artabilir, böylece tümör hücrelerini öldürmek için mevcut olan sitotoksik ve başka bağışıklık sistemi hücrelerinin sayısı artar. Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri (örneğin anti-CTLA4 antikoru) gibi tümöre karşı maddelerin veya ilaçların nüfuzu da artabilir. Hiyalüronan ayrışmasının sitotoksik T hücreleri gibi bağışıklık sistemi hücreleri ile tümör hücreleri arasındaki yüzey temasını arttırması da mümkündür, bu da bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle kombinasyonda biraraya getirildiğinde tümör hücrelerinin öldürülmesinde bir artışla sonuçlanır.

Dolayısıyla, polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş çözünür hiyalüronidaz (örneğin PEGPH20) gibi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin, örneğin ön uygulamayla kullanımı, bir tümörü bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün (örneğin anti-CTLA4 antikoru) varlığında daha da artabilen bağışıklık sistemi dolayımlı yanıtlara duyarlılaştırabilir. Örneğin enzimin önceden uygulanmasıyla sağlandığı gibi, polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim tarafından bağışıklık sistemi hücrelerinin tümöre erişiminin arttırılması, terapötik etkinlik korunurken bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün dozajının azaltılmasına izin verebilir. Antikor dozajının ince ayarının daha etkili bir şekilde yapılabilmesi, antikor terapisiyle ilişkili olabilen olumsuz olaylarda bir azalma sağlayabilir. Dolayısıyla, burada sunulan kombinasyon terapisi, tümörlerin kökünün kazınması ve tümör tedavisi için tümöre karşı bağışıklık yanıtının güçlendirilmesini kolaylaştırabilir.

C. Kombinasyon Terapisi Maddeleri

Burada kanserlerin tedavisinde kullanım için, polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler ve bunun başka formları, örneğin bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim

içeren veziküller ve bunu kodlayan vektör gibi anti-hiyalüronan maddeler ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, örneğin anti-CTLA4 ve anti-PD-1 antikorları gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinlerinin inhibitörlerini içeren buradaki istemlere uygun kombinasyon terapileri sunulmaktadır. Özellikle, burada kanserlerin tedavisinde kullanım için polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, yani PEGPH20 gibi bir hiyalüronidaz ve anti-CTLA4 ve anti-PD-1 antikorları gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin kombinasyon terapileri sunulmaktadır. Buradaki düzenlemelerin amaçları için, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzime (örneğin PH20 gibi bir çözünür hiyalüronidaz) referans, polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimleri (örneğin PEGPH20 gibi polimere konjuge edilmiş çözünür hiyalüronidaz polipeptitleri) kapsar. Özellikle, burada sunulan kombinasyon terapisi, hücre dışı matriste orta ila yüksek HA seviyelerini haiz olmakla özellik kazanan katı tümörlerle (yani HA^{orta} ila $HA^{yüksek}$ tümörler) özellik kazanan kanserlerin tedavisinde kullanılır. Bu kanserlerin örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla pankreas kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, mide kanseri, kolon kanseri, yumurtalık kanseri, baş ve boyun kanseri, akciğer kanseri ve bunun gibi katı tümörlü kanserler yer alır. Kombinasyon terapisi ayrıca başka bir bağışıklık sistemini hedefleyen madde, sitotoksik kemoterapötik ilaç, radyoterapi veya cerrahi tedaviyi içerebilir.

Kombinasyon terapisinde kullanım için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin ve polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler de dâhil olmak üzere anti-hiyalüronan maddelerin sınırlandırıcı olmayan örnekleri aşağıdaki alt bölümlerde sunulmaktadır.

1. Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörleri ve Bunların Formülasyonları

Burada sunulan bileşimler, kombinasyonlar ve usuller ve bunların kullanımları da dâhil olmak üzere kombinasyon terapisi, tümöre karşı bir bağışıklık yanıtını stimüle etmek için bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini bloke eden bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinleri inhibitörlerini içerir. Bu bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri bu alanda bilinmektedir. Bu inhibitörlerin örnekleri Bölüm B'de açıklanmakta ve bunlar arasında Tablo 3'te açıklanan bir inhibitör kontrol noktası proteinini hedefleyen herhangi bir inhibitör antikor yer almaktadır. Örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini veya maddesi bir CTLA4 ve PD-1 inhibitörüdür. Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü bir antikordur. Bölüm B'de Tablo 3, bağışıklık sistemi kontrol noktası

inhibitörlerinin sınırlandırıcı olmayan örneklerini vermektedir. Örnek CTLA4 ve PD-1 inhibitörleri arasında anti-CTLA4 ve anti-PD-1 antikorları yer alır.

Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, bir bağışıklık sistemi kontrol noktası molekülünü (örneğin anti-CTLA4 veya anti-PD-1) bloke eden bir antikordur. Antikor bağışıklık sistemi kontrol noktasını molekülünü (örneğin anti-CTLA4 veya anti-PD-1) immünospesifik olarak bağlayan tam uzunlukta bir antikor veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanıdır. Tam uzunlukta bir antikor dört polipeptit zinciri içerir: iki özdeş ağır (H) zincir (her biri genellikle yaklaşık 440 amino asit içerir) ve iki özdeş hafif (L) zincir (her biri yaklaşık 220 amino asit içerir). Tam uzunlukta antikor zincirleri değişken (V) ve sabit (C) bölge sahaları olarak organize edilmiştir. Hafif zincirler C bölgesine (C_L) ve V bölgesine (V_L) karşılık gelen iki sahaya sahiptir. Ağır zincirler dört sahaya sahiptir: V bölgesi (VH) ve C bölgesinde üç veya dört saha (C_H1, C_H2, C_H3 ve C_H4) ve bazı durumlarda bir menteşe bölgesi. Her ağır zincir bir hafif zincire bir disülfür bağıyla bağlıdır ve iki ağır zincir birbirine disülfür bağlarıyla bağlıdır. Ağır zincirlerin bağlanmasına menteşe bölgesi olarak bilinen ağır zincirin bir esnek bölgesi aracılık eder.

Değişken sahalar, tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR'ler) veya hiper değişken (HV) bölgeler adı verilen üç bölümle antikora antijen spesifitesi verir. CDR bölgeleri kesin olarak tanımlanmış ve antikorlarda evrensel olarak numaralandırılmıştır (örneğin bakınız: Kabat, E.A. ve diğerleri (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Beşinci basım, ABD Sağlık ve İnsani Hizmetler Bakanlığı, NIH Yayın No. 91-3242 ve Chothia, C. ve diğerleri (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; AbM (Martin ve diğerleri (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9268-9272; Martin ve diğerleri (1991) Methods Enzymol 203:121-153; Pedersen ve diğerleri (1992) Immunomethods 1:126-136). Üç ağır zincir CDR'si ve üç hafif zincir CDR'si birlikte, soydaş antijenle fiziksel olarak etkileşime giren ve antikora spesifite veren antikorun antijen bağlama yerini (antikor birleşme yeri) oluşturur.

Sabit bölge, tamamlayıcı ve efektör hücrelerin aktivasyonunu teşvik eder. CDR bölgeleri gibi sabit bölgeler de kesin olarak tanımlanmış ve EU indeksi ve Kabant numaralandırma şemaları kullanılarak antikorlarda evrensel olarak numaralandırılmıştır (örneğin bakınız: Kabat, E.A. ve diğerleri (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Beşinci Basım, ABD Sağlık ve İnsani Hizmetler Bakanlığı, NIH Yayın No. 91-3242). Sabit bölge herhangi bir immünoglobülin sınıfı (örneğin IgG, IgM, IgD, IgE, IgA ve IgY), alt sınıfı (örneğin IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 ve IgA2) veya alt alt sınıfı (örneğin IgG2a ve

IgG2b) olabilir. Özel örneklerde, burada sunulan kombinasyon terapisindeki antikorlar DİZİ İD NO: 288-292'nin herhangi birinde verilen bir IgG1 ağır zincir sabit bölgesi, DİZİ İD NO: 293'te verilen bir IgG2 sabit bölgesi, DİZİ İD NO: 294'te verilen bir IgG3 sabit bölgesi veya DİZİ İD NO: 295'te verilen bir IgG4 sabit bölgesi içeren tam uzunlukta antikorlardır. Burada sunulan kombinasyon terapisindeki antikorlar, bir kappa (κ) ve lambda (λ) hafif zincir sabit bölgesi, örneğin DİZİ İD NO: 297'de verilen bir beşeri lambda hafif zincir sabit bölgesini veya DİZİ İD NO: 296 veya 298'de verilen bir kappa hafif zincir sabit bölgesini de içerebilir.

Burada sunulan kombinasyon terapilerinin amaçları için, tam uzunlukta bir antikor inhibitörünün herhangi bir antijen bağlayıcı fragmanı, örneğin tam uzunlukta antikorların tam dizisinden daha azını içeren, ama tam uzunlukta antikorun spesifik bağlanma kabiliyetlerinin en azından bir bölümünü (örneğin ağır ve hafif zincirin değişken bölümleri) koruyan, tam uzunlukta antikorların türevleri burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanılabilir. Antikor fragmanları, ana antikorun bağlanma afinitesini korumak için bir antikor çerçevesi (örneğin kimerik antikorlar) içine sokulabilen bir antikorun antijen bağlayıcı bölümlerini de içerebilir. Antikor fragmanlarının örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab, Fab', $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları ve modifiye fragmanlar da dâhil olmak üzere başka fragmanlar yer alır (örneğin bakınız: Methods in Molecular Biology, Cilt 207: Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols (2003); Bölüm 1; sayfa 3-25, Kipriyanov). Antikor fragmanları, disülfür köprüleriyle olduğu gibi birbirine bağlı birden fazla zincir içerebilir ve rekombinant olarak üretilebilir. Antikor fragmanları iki veya daha fazla sahayı bağlamak için peptit bağlayıcılar gibi sentetik bağlayıcılar da içerebilir. Antijen bağlayıcı fragmanlar oluşturmanın usulleri bu alanda iyi bilinmektedir ve burada sunulan herhangi bir antikoru modifiye etmek için kullanılabilir. Antikor moleküllerinin fragmanları, örneğin enzimatik yarılmayla oluşturulabilir. Örneğin papainle proteaz yarılması üzerine, ağır zincir sabit bölgelerinin bir dimeri, Fc sahası iki Fab bölgesinden (yani değişken bölgeleri içeren bölümler) yarılır.

Antikor ve diğer bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü terapilerinin sınırlandırıcı olmayan örnekleri aşağıda sunulmaktadır.

a. Anti-CTLA4 terapileri

Kullanıma yönelik bileşimler ve kombinasyonlar da dâhil olmak üzere burada sunulan kombinasyon terapileri CTLA4'ü inhibe eden terapötik antikorları içerir. İnhibitörler antikorları ve aptamerleri içerir. CTLA4'e bağlanan ve CTLA4 sinyallerini inhibe eden antikor ve aptamer inhibitörleri bilinmektedir. CTLA4'ü bağlayan, CTLA4 işlevini inhibe eden ve tümör bağışıklığını arttıran örnek aptamerler (buluşun çerçevesi dışında) açıklanmıştır ve DİZİ İD NO: 11-18'de verilmektedir (Santulli-Marotto (2003) Cancer Res. 63(21):7483-7489; Gilboa ve diğerleri, (2013) Clin Cancer Res 19(5):1054-1062).

Tümöre karşı immünoterapide kullanılan, CTLA4'ü bağlayan ve aktivitesini inhibe eden çeşitli antikorlar açıklanmıştır. Anti-CTLA4 antikorları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla ABD Patentleri No. 6,682,736, 6,984,720; ABD Yayınları No. 2002/0086014; 2009/0074787; Avrupa Patenti No. EP 1262193; ve Uluslararası Patent Yayını No. WO 2000/037504'te açıklananların herhangi biri yer alır. Özellikle, anti-CTLA4 antikorları arasında İpilimumab (MDS-010 veya 10D1 olarak da adlandırılır) ve Tremelimumab (also called Tisilimumab veya CP-675,206 olarak da adlandırılır) yer alır. Bu anti-CTLA4 antikorları kanserlerin tedavisi için çok sayıda klinik çalışmada kullanılmıştır. İpilimumab melanom tedavisi için FDA tarafından onaylanmış ve prostat kanseri, akciğer kanseri ve RCC gibi başka kanserler için klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Tremelimumab CRC, mide kanseri, melanom ve NSCLC tedavisi için klinik çalışmalarda incelenmektedir.

(i) İpilimumab ve Türevleri

Burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım anti-CTLA4 antikorları arasında İpilimumab (MDX-010, MDX-101, 10D1 olarak da adlandırılır; Drug Bank Erişim No. DB06186) veya bunun türevleri, örneğin İpilimumabın varyantları veya antijen bağlayıcı fragmanları yer alır. İpilimumab beşeri CTLA4'ü spesifik olarak bağlayan tamamen beşeri bir IgG1κ monoklonal antikorudur (örneğin ABD Patent Yayını No. 2002/0086014 ve ABD Patenti No. 6,984,720'de 10D1 olarak adlandırılan antikora bakınız). İpilimumabın ağır zinciri, DİZİ İD NO: 21'de verien nükleotit dizisiyle kodlanan, DİZİ İD NO: 22'de verilen amino asit dizisini haiz bir değişken sahaya (V_H) sahiptir. Ağır zincirin tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR'ler) V_H CDR 1 (DİZİ İD NO: 25'te verilmektedir); V_H CDR 2 (DİZİ İD NO: 26'da verilmektedir); ve V_H CDR 3'ü (DİZİ İD NO: 27'de verilmektedir) içerir. İpilimumabın hafif zinciri, DİZİ İD NO: 23'te verilen nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 24'te verilen amino asit dizisini haiz bir

değişken sahaya (V_L) sahiptir. Hafif zincirin CDR'leri arasında V_L CDR 1 (DİZİ İD NO: 28'de verilmektedir); V_L CDR 2 (DİZİ İD NO: 29'da verilmektedir); ve V_L CDR 3 (DİZİ İD NO: 30'da verilmektedir) yer alır. Rekombinant olarak üretildiğinde, İpilimumab dört polipeptit zincirinden oluşur: her biri 447 amino asit içeren iki özdeş ağır zincir ve her biri 215 amino asit içeren iki özdeş kappa hafif zinciri. Her ağır ve hafif zincir çifti bir zincirler arası disülfür bağıyla bağlıdır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-CTLA4 antikoru tam uzunlukta İpilimumabın antijen bağlayıcı fragmanlarını veya varyantlarını da içerir. Antijen bağlayıcı bir fragman en azından İpilimumabın bir değişken ağır zincirini ve/veya değişken hafif zincirini veya bunun CTLA4'ü bağlamak için yeterli bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içerir. Dolayısıyla antikor, üretildiği veya bir antikor olarak biraraya getirildiği zaman, CTLA4'ü immünospesifik olarak bağlamak için değişken ağır zincirin yeterli bir bölümünü ve değişken hafif zincirin yeterli bir bölümünü içerdiği sürece bir antikorun herhangi bir formu olabilir. Örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için anti-CTLA4 antikorları arasında, en azından DİZİ İD NO: 22'de verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zinciri (V_H) ve DİZİ İD NO: 24'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zinciri (V_L) veya DİZİ İD NO: 22 ve DİZİ İD NO: 24'ün CTLA4'ü immünospesifik olarak bağlamak üzere bir antijen bağlanma yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içeren İpilimumabın antijen bağlayıcı fragmanları yer alır. Örneğin antikor fragmanlarının örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab, Fab', $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları yer alır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-CTLA antikoru, İpilumumabın varyantlarını veya bunların varyasyonları içeren antijen bağlayıcı fragmanlarını da içerebilir. Örneğin bir anti-CTLA4 antikoru, DİZİ İD NO: 22'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 24'te verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zincir içeren bir antikoru içerebilir, burada varyant antikor CTLA-4'ü immünospesifik olarak bağlar. Varyasyon bir amino asit ikamesi, amino asitlerin eklenmesi veya silinmesi olabilir. Bazı durumlarda, sadece ağır zincir değişir. Başka durumlarda, sadece hafif zincir değişir. Yine başka durumlarda, ana İpilimumab antikoruna hem ağır zincir hem hafif zincir göre değişir.

(ii) Tremelimumab ve Türevleri

Burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için bir anti-CTLA4 antikoru, Tremelimumab (Tisilimumab, CP-675,206 veya 11.2.1 olarak da adlandırılır) veya bunun türevlerini, örneğin Tremelimumab'ın varyantlarını veya antijen bağlayıcı fragmanlarını içerebilir. Tremelimumab beşeri CTLA4'ü spesifik olarak bağlayan tamamen beşeri bir IgG2 monoklonal antikorudur (örneğin Uluslararası Patent Yayını No. WO 00/37504'te 11.2.1 olarak adlandırılan antikora bakınız). Tremelimumabın ağır zinciri DİZİ İD NO: 33'te verilen nükleotit dizisiyle kodlanan, DİZİ İD NO: 34'te verilen amino asit dizisini haiz bir değişken sahaya (V_H) sahiptir. Ağır zincirin tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR'ler) V_H CDR 1 (DİZİ İD NO: 282'de verilmektedir); V_H CDR 2 (DİZİ İD NO: 283'te verilmektedir); and V_H CDR 3'ü (DİZİ İD NO: 284'te verilmektedir) içerir. Tremelimumabın hafif zinciri DİZİ İD NO: 35'te verilen nükleotit dizisiyle kodlanan, DİZİ İD NO: 36'da verilen amino asit dizisini haiz bir değişken sahaya (V_L) sahiptir. Hafif zincirin CDR'leri arasında V_L CDR 1 (DİZİ İD NO: 285'te verilmektedir); V_L CDR 2 (DİZİ İD NO: 286'da verilmektedir); ve V_L CDR 3 (DİZİ İD NO: 287'de verilmektedir) yer alır. Rekombinant olarak üretildiğinde, Tremelimumab dört polipeptit zincirinden oluşur: iki özdeş ağır zincir ve iki özdeş kappa hafif zinciri. Her ağır ve hafif zincir çifti bir zincirler arası disülfür bağıyla bağlıdır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-CTLA4 antikoru tam uzunlukta Tremelimumabın antijen bağlayıcı fragmanlarını veya varyantlarını da içerir. Antijen bağlayıcı bir fragman en azından Tremelimumabın bir değişken ağır zincirini ve/veya değişken hafif zincirini veya bunun CTLA4'ü bağlamak için yeterli bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içerir. Dolayısıyla antikor, üretildiği veya bir antikor olarak biraraya getirildiği zaman, CTLA4'ü immünospesifik olarak bağlamak için değişken ağır zincirin yeterli bir bölümünü ve değişken hafif zincirin yeterli bir bölümünü içerdiği sürece bir antikorun herhangi bir formu olabilir. Örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için anti-CTLA4 antikorları arasında, en azından DİZİ İD NO: 34'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zinciri (V_H) ve DİZİ İD NO: 36'da verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zinciri (V_L) veya DİZİ İD NO: 34 ve DİZİ İD NO: 36'nın CTLA4'ü immünospesifik olarak bağlamak üzere bir antijen bağlanma yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içeren Tremelimumabın antijen bağlayıcı fragmanları yer alır. Örneğin antikor fragmanlarının örnekleri arasında

sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab, Fab', $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları yer alır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-CTLA antikoru, Tremelimumabın varyantlarını veya bunların varyasyonları içeren antijen bağlayıcı fragmanlarını da içerebilir. Örneğin bir anti-CTLA4 antikoru, DİZİ İD NO: 34'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 36'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zincir içeren bir antikoru içerebilir, burada varyant antikor CTLA-4'ü immünospesifik olarak bağlar. Varyasyon bir amino asit ikamesi, amino asitlerin eklenmesi veya silinmesi olabilir. Bazı durumlarda, sadece ağır zincir değişir. Başka durumlarda, sadece hafif zincir değişir. Yine başka durumlarda, ana Tremelimumab antikoruna göre hem ağır zincir hem hafif zincir değişir.

Tremelimumab varyantları bu alanda bilinmektedir (örneğin bakınız: Uluslararası Patent Yayını No. WO 00/37504'te N294). Bazı örneklerde, beşeri olmayan kaynaklardan saflaştırılan antikor örneğin beşeri olmayan glikosilasyondan kaynaklanan immünojenisite, farmakokinetik ve/veya efektör işlevlerindeki değişiklikleri önlemek üzere bir glikosilasyon yerini elimine etmek için modifiye edilir. Örneğin bazı varyantlarda, glikosilasyonu önlemek için bir asparagin glutaminle (Q) değiştirilebilir (örneğin N294Q).

b. Anti-PD-1 ve Anti-PD-Ll Terapileri

Bileşimler ve usuller ve bunların kullanımları da dâhil olmak üzere burada sunulan kombinasyon terapileri PD-1 veya PD-L1' inhibe eden terapötik antikorları içerir. İnhibitörler antikorları ve füzyon proteinleri, aptamerleri içerir. PD-1 veya PD-L1'e bağlanan ve PD-1 inhibtör sinyallerini inhibe eden antikor, aptamer ve füzyon proteini inhibitörleri bilinmektedir. Örnek füzyon proteinleri (buluşun çerçevesi dışında) arasında Uluslararası Patent Yayınları No. WO2010/027827 ve WO201 1/066342'de açıklanan bir PD-L2-Fc füzyon çözünür reseptörü olan AMP-224 (B7-DCIg olarak bilinir) yer alır.

Tümöre karşı immünoterapide kullanılan, PD-1 veya PD-L1'i bağlayan ve PD-1 inhibitör aktivitesini inhibe eden çeşitli antikorlar açıklanmıştır. Anti-PD-1 antikorları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla ABD Patentleri No. 7,943,743, 8,008,449, 8,779,105, 8,735,553; ABD Yayınları No. 2005/0180969; 2007/0166281; Uluslararası Patent Yayını

No. WO 2008/156712'de açıklananların herhangi biri yer alır. Anti-PD-L1 antikorları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla ABD Yayınları No. 2013/0034559 ve 2013/0045202; ABD Patentleri No. 7,943,743, 8,217,149, 8,679,767 ve 8,779,108; ve Uluslararası Yayınlar No. WO 2010/077634 ve WO 2013/019906'da açıklananların herhangi biri yer alır.

(i) Anti-PD-1 antikorları

Özellikle, anti-PD-1 antikorları arasında Nivolumab (BMS-936558; MDX-1106; veya ONO-4538 olarak da adlandırılır), MK-3475 (Pembrolizumab veya Lambrolizumab olarak da bilinir), Pidilizumab (veya CT-011) ve AMP-224 yer alır. Bu anti-PD-1 antikorları, melanom, NSCLC, RCC, hematolojik habasetler, lenfomalar, lösemiler, pankreas kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri ve multipl miyelom gibi kanserlerin tedavisi için çok sayıda klinik çalışmada kullanılmıştır.

(a) Nivolumab ve Türevleri

Burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için bir anti-PD-1 antikoru Nivolumab (BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 veya 5C4 olarak da bilinir) veya bunun türevlerini, örneğin Nivolumabın varyantlarını veya antijen bağlayıcı fragmanlarını içerir. Nivolumab spesifik olarak beşeri PD-1'i bağlayan tamamen beşeri bir IgG4 monoklonal antikorudur (örneğin ABD Patenti No. 8,008,449'da 5C4 olarak adlandırılan antikora bakınız). Nivolumabın ağır zinciri DİZİ İD NO: 53'te verilen nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 54'te verilen amino asit dizisini haiz bir değişken sahaya (V_H) sahiptir. Ağır zincirin tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR'ler) V_H CDR 1 (DİZİ İD NO: 57'de verilmektedir); V_H CDR 2 (DİZİ İD NO: 58'de verilmektedir); ve V_HCDR 3'ü (DİZİ İD NO: 59'da verilmektedir) içerir. Nivolumabın hafif zinciri DİZİ İD NO: 55'te verilen nükleotit dizisiyle kodlanan, DİZİ İD NO: 56'da verilen amino dizisini haiz bir değişken sahaya (V_L) sahiptir. Hafif zincirin CDR'leri V_L CDR 1 (DİZİ İD NO: 60'ta verilmektedir); V_L CDR 2 (DİZİ İD NO: 61'de verilmektedir); ve V_L CDR 3'ü (DİZİ İD NO: 62'de verilmektedir) içerir. Rekombinant olarak üretildiğinde, Nivolumab dört polipeptit zincirinden oluşur: iki özdeş ağır zincir ve iki özdeş kappa hafif zinciri. Her ağır ve hafif zincir çifti bir zincirler arası disülfür bağıyla bağlıdır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-1 antikoru tam uzunlukta Nivolumabın antijen bağlayıcı fragmanlarını veya varyantlarını da içerir. Antijen bağlayıcı bir fragman en azından Nivolumabın bir değişken ağır zincirini ve/veya değişken hafif zincirini veya

bunun PD-1'i bağlamak için yeterli bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içerir. Dolayısıyla antikor, üretildiği veya bir antikor olarak biraraya getirildiği zaman, PD-1'i immünospesifik olarak bağlamak için değişken ağır zincirin yeterli bir bölümünü ve değişken hafif zincirin yeterli bir bölümünü içerdiği sürece bir antikorun herhangi bir formu olabilir. Örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için anti-PD-1 antikorları arasında, en azından DİZİ İD NO: 54'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zinciri (V_H) ve DİZİ İD NO: 56'da verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zinciri (V_L) veya DİZİ İD NO: 54 ve DİZİ İD NO: 56'nın PD-1'i immünospesifik olarak bağlamak üzere bir antijen bağlanma yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içeren Nivolumabın antijen bağlayıcı fragmanları yer alır. Örneğin antikor fragmanlarının örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab, Fab', $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları yer alır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-1 antikoru, Nivolumabın varyantlarını veya bunların varyasyonları içeren antijen bağlayıcı fragmanlarını da içerebilir. Örneğin bir anti-PD-1 antikoru, DİZİ İD NO: 54'te verilen değişken ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 56'da verilen değişken hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zincir içeren bir antikoru içerebilir, burada varyant antikor PD-1'i immünospesifik olarak bağlar. Varyasyon bir amino asit ikamesi, amino asitlerin eklenmesi veya silinmesi olabilir. Bazı durumlarda, sadece ağır zincir değişir. Başka durumlarda, sadece hafif zincir değişir. Yine başka durumlarda, ana Nivolumab antikoruna göre hem ağır zincir hem hafif zincir değişir.

(b) MK-3475 ve Türevleri

Burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için bir anti-PD-1 antikoru, MK-3475'i (Pembrolizumab, Lambrolizumab veya h409A11 olarak da adlandırılır) veya bunun türevlerini, örneğin MK-3475'in varyantlarını veya antijen bağlayıcı fragmanlarını içerebilir. MK-3475 spesifik olarak beşeri PD-1'i bağlayan beşeri özellikler verilmiş bir IgG4κ monoklonal antikorudur (örneğin Uluslararası Patent Yayını (WO 2008/156712'de h409A11 olarak adlandırılan antikora bakınız). MK-3475'in tam ağır zinciri DİZİ İD NO: 63'te verilen nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 64'te verilen amino asit

dizisine sahiptir ve tam hafif zincir DİZİ İD NO: 65'te verilen bir nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 66'da verilen amino asit dizisine sahiptir. Ağır zincir DİZİ İD NO: 67'de verilen bir nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 68'de verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken sahadan (V_H) oluşur. Hafif zincir DİZİ İD NO: 69'da verilen bir nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 70'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken saha (V_L) ve beşeri özellikler verilmiş bir kappa hafif sabit bölgesinden oluşur. Rekombinant olarak üretildiğinde, MK-3475 dört polipeptit zincirinden oluşur: her biri 447 amino asit içeren iki özdeş ağır zincir ve her biri 218 amino asit içeren iki özdeş kappa hafif zinciri. Her ağır ve hafif zincir çifti bir zincirler arası disülfür bağıyla bağlıdır.

MK-3475'in CDR'leri arasında V_H CDR 1 (DİZİ İD NO: 71); V_HCDR 2 (DİZİ İD NO: 72); V_H CDR 3 (DİZİ İD NO: 73); V_L CDR 1 (DİZİ İD NO: 74); V_L CDR 2 (DİZİ İD NO: 75); ve V_L CDR 3 (DİZİ İD NO: 76) yer alır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-1 antikoru, MK-3475'in varyantlarını da içerebilir. Örneğin bir anti-PD-1 antikoru, DİZİ İD NO: 64'te verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir ağır zincir ve DİZİ İD NO: 66'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir hafif zincir içeren bir antikoru içerebilir. Varyasyon bir amino asit ikamesi, amino asitlerin eklenmesi veya silinmesi olabilir. Bazı durumlarda, sadece ağır zincir değişir. Başka durumlarda, sadece hafif zincir değişir. Yine başka durumlarda, ana MK-3475 antikoruna göre hem ağır zincir hem hafif zincir değişir.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-1 antikoru, tam uzunlukta MK-3475'in antijen bağlayıcı fragmanlarını veya varyantlarını da içerir. Antijen bağlayıcı bir fragman en azından MK-3475'in bir değişken ağır zincirini ve/veya değişken hafif zincirini veya bunun PD-1'i bağlamak için yeterli bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içerir. Dolayısıyla antikor, üretildiği veya bir antikor olarak biraraya getirildiği zaman, PD-1'i immünospesifik olarak bağlamak için değişken ağır zincirin yeterli bir bölümünü ve değişken hafif zincirin yeterli bir bölümünü içerdiği sürece bir antikorun herhangi bir formu olabilir. Örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için anti-PD-1 antikorları, en azından DİZİ İD NO: 68'de verilen bir amino asit dizisini

haiz bir değişken ağır zinciri (V_H) ve DİZİ İD NO: 70'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zinciri (V_L) veya DİZİ İD NO: 68 ve DİZİ İD NO: 70'in PD-1'i immünospesifik olarak bağlamak üzere bir antijen bağlanma yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içerir. Örneğin antikor fragmanlarının örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab, Fab', $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları yer alır.

(c) Pidilizumab ve Türevleri

Burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için bir anti-PD-1 antikoru Pidilizumab (hBAT-1 veya CT-011 olarak da adlandırılır) veya bunun türevlerini, örneğin Pidilizumabın varyantlarını veya antijen bağlayıcı fragmanlarını içerir. Pidilizumab B lenfoid hücre membranlarına karşı oluşturulan ve T-hücresine ve NK-hücresine dayanan aktivitelere yol açtığı gösterilmiş olan, bir murin antikorundan (BAT)oluşturulan beşeri özellikler verilmiş bir IgG1κ monoklonal antikorudur. Pidilizumab beşeri PD-1'i bağlar (örneğin US 2005/0180969'da BAT-1 $R\kappa_D/RH_C$ olarak adlandırılan antikora bakınız). Pidilizumabın tam ağır zinciri DİZİ İD NO: 77'de verilen bir nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 78'de verilen amino asit dizisine sahiptir ve tam hafif zincir DİZİ İD NO: 79'da verilen bir nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 80'de verilen amino asit dizisine sahiptir. Ağır zincir DİZİ İD NO: 81'de verilen bir nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 82'de verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken sahadan (V_H) oluşur. Hafif zincir DİZİ İD NO: 83'te verilen bir nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 84'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken saha (V_L) ve beşeri özellikler verilmiş bir kappa hafif sabit bölgesinden oluşur. Rekombinant olarak üretildiğinde, Pidilizumab dört polipeptit zincirinden oluşur: iki özdeş ağır zincir ve iki özdeş kappa hafif zinciri. Her ağır ve hafif zincir çifti bir zincirler arası disülfür bağıyla bağlıdır.

Pidilizumab'ın CDR'leri arasında V_H CDR 1 (DİZİ İD NO: 85'te verilen amino asit dizisi); V_H CDR 2 (DİZİ İD NO: 86'da verilen amino asit dizisi); V_H CDR 3 (DİZİ İD NO: 87'de verilen amino asit dizisi); V_L CDR 1 (DİZİ İD NO: 88'de verilen amino asit dizisi); V_L CDR 2 (DİZİ İD NO: 89'da verilen amino asit dizisi); ve V_L CDR 3 (DİZİ İD NO: 90'da verilen amino asit dizisi) yer alır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-1 antikoru, Pidilizumabın varyantlarını da içerebilir. Örneğin bir anti-PD-1 antikoru, DİZİ İD NO: 78'de verilen ağır zincire en az

%85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir ağır zincir ve DİZİ İD NO: 80'de verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir hafif zincir içeren bir antikoru içerebilir. Varyasyon bir amino asit ikamesi, amino asitlerin eklenmesi veya silinmesi olabilir. Bazı durumlarda, sadece ağır zincir değişir. Başka durumlarda, sadece hafif zincir değişir. Yine başka durumlarda, ana Pidilizumab antikoruna göre hem ağır zincir hem hafif zincir değişir.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-1 antikoru, tam uzunlukta Pidilizumabın antijen bağlayıcı fragmanlarını veya varyantlarını da içerir. Antijen bağlayıcı bir fragman en azından Pidilizumabın bir değişken ağır zincirini ve/veya değişken hafif zincirini veya bunun PD-1'i bağlamak için yeterli bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içerir. Dolayısıyla antikor, üretildiği veya bir antikor olarak biraraya getirildiği zaman, PD-1'i immünospesifik olarak bağlamak için değişken ağır zincirin yeterli bir bölümünü ve değişken hafif zincirin yeterli bir bölümünü içerdiği sürece bir antikorun herhangi bir formu olabilir. Örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için anti-PD-1 antikorları, en azından DİZİ İD NO: 82'de verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zinciri (V_H) ve DİZİ İD NO: 84'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zinciri (V_L) veya DİZİ İD NO: 82 ve DİZİ İD NO: 84'ün PD-1'i immünospesifik olarak bağlamak üzere bir antijen bağlanma yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içerir. Örneğin antikor fragmanlarının örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab, Fab', $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları yer alır.

(ii). Anti-PD-Ll antikorları

Özellikle, anti-PD-L1 (veya anti-B7H1) antikorları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla BMS-936559 (veya MDX-1105), MPDL3280A (veya RG7446) ve MED14736 adı verilen antikorlar yer alır. Bu anti-PD-L1 antikorları melanom, NSCLC, yumurtalık kanseri, RCC ve akciğer kanseri gibi kanserlerin tedavisi için çok sayıda klinik çalışmada kullanılmıştır.

(a) BMS-936559 ve Türevleri

Burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için bir anti-PD-L1 antikoru BMS-936559 (MDX-1105 veya 12A4 olarak da bilinir) veya bunun türevlerini, örneğin BMS-

936559'un varyantlarını veya antijen bağlayıcı fragmanlarını içerebilir. BMS-936559 beşeri PD-L1'i spesifik olarak bağlayan tamamen beşeri bir IgG4 monoklonal antikorudur (örneğin ABD Patenti No. 7,943,743'te 12A4 olarak adlandırılan antikora bakınız), BMS-936559'un ağır zinciri DİZİ İD NO: 91'de verilen nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 92'de verilen amino asit dizisini haiz bir değişken sahaya (V_H) sahiptir. Ağır zincirin tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR'ler) V_H CDR 1 (DİZİ İD NO: 95'te verilmektedir); V_H CDR 2 (DİZİ İD NO: 96'da verilmektedir); ve V_HCDR 3'ü (DİZİ İD NO: 97'de verilmektedir) içerir. BMS-936559'un hafif zinciri DİZİ İD NO: 93'te verilen nükleotit dizisiyle kodlanan, DİZİ İD NO: 94'te verilen amino dizisini haiz bir değişken sahaya (V_L) sahiptir. Hafif zincirin CDR'leri V_L CDR 1 (DİZİ İD NO: 98'de verilmektedir); V_L CDR 2 (DİZİ İD NO: 99'da verilmektedir); ve V_L CDR 3'ü (DİZİ İD NO: 100'de verilmektedir) içerir. Rekombinant olarak üretildiğinde, BMS-936559 dört polipeptit zincirinden oluşur: iki özdeş ağır zincir ve iki özdeş kappa hafif zinciri. Her ağır ve hafif zincir çifti bir zincirler arası disülfür bağıyla bağlıdır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-L1 antikoru, tam uzunlukta BMS-936559'un antijen bağlayıcı fragmanlarını veya varyantlarını da içerir. Antijen bağlayıcı bir fragman en azından BMS-936559'un bir değişken ağır zincirini ve/veya değişken hafif zincirini veya bunun PD-L1'i bağlamak için yeterli bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içerir. Dolayısıyla antikor, üretildiği veya bir antikor olarak biraraya getirildiği zaman, PD-L1'i immünospesifik olarak bağlamak için değişken ağır zincirin yeterli bir bölümünü ve değişken hafif zincirin yeterli bir bölümünü içerdiği sürece bir antikorun herhangi bir formu olabilir. Örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için anti-PD-L1 antikorları, en azından DİZİ İD NO: 92'de verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zinciri (V_H) ve DİZİ İD NO: 94'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zincir (V_L) veya DİZİ İD NO: 92 ve DİZİ İD NO: 94'ün PD-L1'i immünospesifik olarak bağlamak üzere bir antijen bağlanma yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içeren BMS-936559'un antijen bağlayıcı fragmanlarını içerir. Örneğin antikor fragmanlarının örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab, Fab', $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları yer alır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-L1 antikoru, BMS-936559'un varyantlarını veya varyasyonları içeren antijen bağlayıcı fragmanlarını da içerebilir. Örneğin bir anti-PD-L1 antikoru, DİZİ İD NO: 92'de verilen değişken ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99

dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 94'te verilen değişken hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zincir içeren bir antikoru içerebilir, burada varyant antikor immünospesifik olarak PD-L1'i bağlar. Varyasyon bir amino asit ikamesi, amino asitlerin eklenmesi veya silinmesi olabilir. Bazı durumlarda, sadece ağır zincir değişir. Başka durumlarda, sadece hafif zincir değişir. Yine başka durumlarda, ana BMS-936559 antikoruna göre hem ağır zincir hem hafif zincir değişir.

(b) MPDL3280A ve Türevleri

Burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için bir anti-PD-L1 antikoru MPDL3280A (RG7446 olarak da bilinir) veya bunun türevlerini, örneğin MPDL3280A'nın varyantlarını veya antijen bağlayıcı fragmanlarını içerebilir. MPDL3280A beşeri PD-L1'i spesifik olarak bağlayan tamamen beşeri bir IgG4 monoklonal antikorudur (örneğin ABD Patenti No. 8,217,149 ve Uluslararası Patent Yayını No. WO 2013/019906'ya bakınız). MPDL3280A DİZİ İD NO: 114'te verilen amino asit dizisini haiz bir ağır zincir değişken sahası (V_H) ve DİZİ İD NO: 115'te verilen amino asit dizisini haiz bir hafif zincir değişken sahası (V_L) içerir. Tam uzunlukta antikor DİZİ İD NO: 318 veya 320'de verilen amino asitlerin bir ağır zincir dizisini ve DİZİ İD NO: 319'da verilen amino asitlerin bir hafif zincir dizisini içerir. Tam uzunlukta antikorun DİZİ İD NO: 112'de verilen amino asitlerin bir ağır zincir dizisini ve DİZİ İD NO: 113'te verilen hafif zincir dizisini içerdiği bildirilmektedir (bkz: Uluslararası Patent Yayını No. WO 2013019906). Ağır zincirin tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR'ler) V_H CDR 1 (DİZİ İD NO: 116'da verilmektedir); V_H CDR 2 (DİZİ İD NO: 117'de verilmektedir); ve V_H CDR 3'ü (DİZİ İD NO: 118'de verilmektedir) içerir. Hafif zincirin CDR'leri V_L CDR 1 (DİZİ İD NO: 119'da verilmektedir); V_L CDR 2 (DİZİ İD NO: 120'de verilmektedir); ve V_L CDR 3'ü (DİZİ İD NO: 121'de verilmektedir) içerir. Rekombinant olarak üretildiğinde, MPDL3280A dört polipeptit zincirinden oluşur: iki özdeş ağır zincir ve iki özdeş kappa hafif zinciri. Her ağır ve hafif zincir çifti bir zincirler arası disülfür bağıyla bağlıdır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-L1 antikoru, MPDL3280A'nın varyantlarını veya varyasyonları içeren antijen bağlayıcı fragmanlarını da içerebilir. Örneğin bir anti-PD-L1 antikoru, DİZİ İD NO: 112, 318 veya 320'de verilen ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98

veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir ağır zincir ve DİZİ İD NO: 113 veya 319'da verilen hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir hafif zincir içeren bir antikoru içerebilir, burada varyant antikor immünospesifik olarak PD-L1'i bağlar. Varyasyon bir amino asit ikamesi, amino asitlerin eklenmesi veya silinmesi olabilir. Bazı durumlarda, sadece ağır zincir değişir. Başka durumlarda, sadece hafif zincir değişir. Yine başka durumlarda, ana MPDL3280A antikoruna göre hem ağır zincir hem hafif zincir değişir.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-L1 antikoru, tam uzunlukta MPDL3280A'nın antijen bağlayıcı fragmanlarını veya varyantlarını da içerir. Antijen bağlayıcı bir fragman en azından MPDL3280A'nın bir değişken ağır zincirini ve/veya değişken hafif zincirini veya bunun PD-L1'i bağlamak üzere yeterli bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içerir. Dolayısıyla antikor, üretildiği veya bir antikor olarak biraraya getirildiği zaman, PD-L1'i immünospesifik olarak bağlamak için değişken ağır zincirin yeterli bir bölümünü ve değişken hafif zincirin yeterli bir bölümünü içerdiği sürece bir antikorun herhangi bir formu olabilir. Örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için anti-PD-L1 antikorları, en azından DİZİ İD NO: 114'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zinciri (V_H) ve DİZİ İD NO: 115'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zinciri (V_L) veya DİZİ İD NO: 114 ve DİZİ İD NO: 115'in PD-L1'i immünospesifik olarak bağlamak üzere bir antijen bağlanma yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içeren MPDL3280A'nın antijen bağlayıcı fragmanlarını içerir. Örneğin antikor fragmanlarının örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab, Fab', $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları yer alır.

(c) MEDI4736 ve Türevleri

Burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için bir anti-PD-L1 antikoru MEDI4736 veya bunun türevlerini, örneğin MEDI4736'nın varyantlarını veya antijen bağlayıcı fragmanlarını içerebilir. MEDI4736 beşeri PD-L1'i spesifik olarak bağlayan tamamen beşeri bir IgG1 monoklonal antikorudur (örneğin ABD Patent Yayını No. 2013/0034559'da 2.7A4OPT olarak adlandırılan antikora bakınız). MEDI4736'nın ağır zinciri DİZİ İD NO: 101'de verilen nükleotit dizisi tarafından kodlanan, DİZİ İD NO: 102'de verilen amino asit dizisini haiz bir değişken sahaya (V_H) sahiptir. Ağır zincirin

tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR'ler) V_H CDR 1 (DİZİ İD NO: 105'te verilmektedir); V_H CDR 2 (DİZİ İD NO: 106'da verilmektedir); ve V_HCDR 3'ü (DİZİ İD NO: 107'de verilmektedir) içerir. MEDI4736'nın hafif zinciri DİZİ İD NO: 103'te verilen nükleotit dizisiyle kodlanan, DİZİ İD NO: 104'te verilen amino dizisini haiz bir değişken sahaya (V_L) sahiptir. Hafif zincirin CDR'leri V_L CDR 1 (DİZİ İD NO: 108'de verilmektedir); V_L CDR 2 (DİZİ İD NO: 109'da verilmektedir); ve V_L CDR 3'ü (DİZİ İD NO: 110'da verilmektedir) içerir. Rekombinant olarak üretildiğinde, MEDI4736 dört polipeptit zincirinden oluşur: iki özdeş ağır zincir ve iki özdeş kappa hafif zinciri. Her ağır ve hafif zincir çifti bir zincirler arası disülfür bağıyla bağlıdır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-L1 antikoru, tam uzunlukta MEDI4736'nın antijen bağlayıcı fragmanlarını veya varyantlarını da içerir. Antijen bağlayıcı bir fragman en azından MEDI4736'nın bir değişken ağır zincirini ve/veya değişken hafif zincirini veya bunun PD-L1'i bağlamak için yeterli bir antijen bağlama yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içerir. Dolayısıyla antikor, üretildiği veya bir antikor olarak biraraya getirildiği zaman, PD-L1'i immünospesifik olarak bağlamak için değişken ağır zincirin yeterli bir bölümünü ve değişken hafif zincirin yeterli bir bölümünü içerdiği sürece bir antikorun herhangi bir formu olabilir. Örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için anti-PD-L1 antikorları, en azından DİZİ İD NO: 102'de verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zinciri (V_H) ve DİZİ İD NO: 104'te verilen bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zinciri (V_L) veya DİZİ İD NO: 102 ve DİZİ İD NO: 104'ün PD-L1'i immünospesifik olarak bağlamak üzere bir antijen bağlanma yeri oluşturmak için yeterli bir bölümünü içeren MEDI4736'nın antijen bağlayıcı fragmanlarını içerir. Örneğin antikor fragmanlarının örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Fab, Fab', $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), Fv, dsFv, diakor, Fd ve Fd' fragmanları yer alır.

Burada sunulan kombinasyon terapisindeki anti-PD-L1 antikoru, MEDI4736'nın varyantlarını veya varyasyonları içeren antijen bağlayıcı fragmanlarını da içerebilir. Örneğin bir anti-PD-L1 antikoru, DİZİ İD NO: 102'de verilen değişken ağır zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir değişken ağır zincir ve DİZİ İD NO: 104'te verilen değişken hafif zincire en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisini haiz bir değişken hafif zincir içeren bir antikoru içerebilir, burada varyant antikor immünospesifik olarak PD-L1'i bağlar. Varyasyon bir amino asit ikamesi, amino asitlerin

eklenmesi veya silinmesi olabilir. Bazı durumlarda, sadece ağır zincir değişir. Başka durumlarda, sadece hafif zincir değişir. Yine başka durumlarda, ana MEDI4736 antikoruna göre hem ağır zincir hem hafif zincir değişir.

c. Başka immünomodülatör terapiler

Burada sunulan kombinasyonlar, usuller ve kullanımlarda kullanım için düşünülen diğer immünomodülatör maddeler arasında inhibitör reseptörler lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG3) ve T hücresi membran proteini 3'ü (TIM3) hedefleyen inhibitör maddeler, PD-L2 (veya B7-H2), B7-H3, B7-H4 ve CD25 gibi inhibitör ligandlar ve immünosüpresif enzim İndoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) yer alır. LAG3'e yönelik maddeler (örneğin füzyon proteini IMP321 ve birçok mAb) ve anti B7-H3 antikorları (örneğin MGA271) karakterize edilmiştir ve klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. B7-H4 ve TIM3 antikorları veya inhibitör maddeleri klinik öncesi geliştirme aşamasındadır (Pardoll, Nat Rev Cancer. 2012 Mar 22;12(4):252-264). Bu maddelerin herhangi biri veya daha fazlası burada sunulan kombinasyonların herhangi birine dâhil edilebilir.

Bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinlerini hedefleyen ve inhibe eden inhibitör antikorların yanı sıra, hedef proteinini/reseptörünü bağlayarak bir bağışıklık yanıtını stimüle edebilen agonistik antikorların burada sunulan kombinasyonlar, usuller ve kullanımlarda kullanımı düşünülmektedir. Örneğin Urelumab (BMS-663513 ve anti-4-1BB olarak da bilinir) reseptörlerin tümör nekroz faktörü (TNF)/sinir büyüme faktörü (NGF) familyasının bir üyesi olan ve dendritik hücreler, foliküler dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, granülositler ve enflamasyon yerlerinde kan damarı cidarlarının hücrelerinde eksprese olup, immünostimülatör özelliklere sahip olan, CD137 koreseptörünü hedefleyen agonistik beşeri özellikler verilmiş bir monoklonal antikordur. Urelumab, spesifik olarak CD137 eksprese eden bağışıklık sistemi hücrelerine bağlanır ve onları aktive eder, burada sunulan bir kombinasyon terapisinin bir parçası olarak uygulandığında tümör hücrelerine karşı oluşabilen bir bağışıklık yanıtını, özellikle bir sitotoksik T hücresi yanıtını stimüle eder (örneğin bakınız: Vinay ve diğerleri, (2012) Mol Cancer Ther. 11(5):1062-1070). Snell ve diğerleri tarafından, Immunol Rev. 244:197-217 (2011)'de açıklananların herhangi biri gibi başka 4-1BB agonistleri de burada sunulan kombinasyonlara dâhil edilebilir. OX40 (CD134 olarak da bilinir), Weinberg ve diğerleri tarafından Immunol Rev. 244(1):218-231 (2011)'de açıklananlar gibi OX40 agonistleri burada sunulan kombinasyonlara dâhil edilerek hedeflenebilen, TNF familyasının başka bir

immünostimülatör reseptörüdür. 4-1BB veya OXO40 sinyallerini bağlayan ve stimüle eden aptamer ligandları da açıklanmıştır (Gilboa ve diğerleri, Clin Cancer Res. 19(5):1054-1062) ve burada sunulan kombinasyon terapilerine dâhil edilmeleri düşünülmektedir.

2. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzimler ve Polimere Konjuge Edilen Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzimler

Burada sunulan, kombinasyonları ve kullanıma yönelik kombinasyonları içeren kombinasyon terapisi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim içerir. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, hedefine ulaşacağı ve özellikle yükselmiş periselüler HA içeren bir tümör hücresine ulaşacağı şekilde uygulanabilen bir enzimdir. Örneğin, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim sürekli infüzyonla uygulanabilir veya lokal olarak enjekte edilebilir, bir polimerle modifiye edilebilir veya aglikosile bir formdadır veya aglikosile olacak veya glikosilasyonu azalacak şekilde modifiye edilir. Bir örnekte, sunulan bileşimler ve kombinasyonlar, tipik olarak hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin yarılanma ömrünü arttırmak için, örneğin bir hastada uzun süreli/kalıcı tedavi etkilerini desteklemek için, bir veya daha fazla polimerik moleküle (polimer) konjugasyonla modifiye edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, özellikle bir hiyalüronidaz, örneğin bir çözünür hiyalüronidaz (örneğin bir PH20 veya budanmış PH20) içerir.

Hiyalüronan hücre dışı matrisin bir bileşeni ve interstisyel bariyerin önemli bir bileşenidir. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler hiyalüronanın hidrolizini katalize ederek, hiyalüronanın viskozitesini azaltır, böylece doku geçirgenliğini arttırır ve parenteral olarak uygulanan akışkanların emilim hızını arttırır. Hiyalüronidaz gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler hiyalüronik aside (HA) müdahale eder ve onu ayrıştırır. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerle tedavi, dokunun söneceği, kan damarlarının genişleyeceği ve bölge içinden daha fazla kanın akabileceği şekilde hiyalüronanı azaltır. Dolayısıyla, hiyalüronidazlar gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler örneğin dispersiyonlarını ve tatbiklerini arttırmak için başka maddeler, ilaçlar ve proteinlerle birlikte yayıcı veya dağıtıcı maddeler olarak kullanılmıştır.

Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, tekrarlanan disakarit birimleri, dönüşümlü β-1→4 ve β-1→3 glikozidik bağlarıyla bağlı, D-glukuronik asit (GlcA) ve N-asetil-D-glukozaminden (GlcNAc) oluşan hiyalüronan polimerlerini yararak hiyalüronanı ayrıştırma etkisi yaparlar. Hiyalüronan zincirleri yaklaşık 25,000 veya daha fazla disakarit tekrarı uzunluğuna

ulaşabilir ve hiyalüronan polimerleri *in vivo* yaklaşık 5,000 ila 20,000,000 Da büyüklüğünde olabilir. İnterstisyel bariyerin önemli bir bileşeni olan hiyalüronanın hidrolizini katalize ederek, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler hiyalüronanın viskozitesini azaltır, böylece doku geçirgenliğini arttırır.

Dolayısıyla, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler arasında, bir hiyalüronan disakarit zincirinin veya polimerinin yarılmasını katalize etme kabiliyetine sahip herhangi bir enzim yer alır. Bazı örneklerde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim hiyalüronan zincirindeki veya polimerindeki β-1→4 glikozidik bağını yarar. Başka örneklerde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim hiyalüronan zincirindeki veya polimerindeki β-1→3 glikozidik bağının yarılmasını katalize eder.

Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler arasında hiyalüronidazların yanı sıra, hiyalüronanı yarma kabiliyetine sahip kondroitinazlar ve liyazlar gibi başka enzimler yer alır. Ayrıca, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler arasında bunların hücrelerde eksprese edilebilen ve salgılanabilen çözünür formları da yer alır. Aşağıda açıklandığı gibi, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler membrana bağlı veya hücrelerden salgılanabilen çözünür formlarda var olur. Buradaki amaçlar için, buradaki kombinasyonlardaki ve kullanıma yönelik kombinasyonlardaki kullanım için çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler sunulmaktadır. Dolayısıyla, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin bir glikosilfosfatidilinozitol (GPI) çapası içerdiği ve/veya başka türlü membrana bağlı veya çözünmez olduğu durumda, bu hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, enzimi salgılanmış ve çözünür hale getirmek için GPI çapasının tamamının veya bir bölümünün budanması veya silinmesiyle çözünür formda temin edilebilir. Dolayısıyla, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler budanmış varyantları, örneğin bir GPI çapasının tamamını veya bir bölümünü çıkarmak için budanmış varyantları içerir. Bu çözünür hiyalüronidazların örnekleri arasında ABD Patenti No. 7,767,429; ABD Yayınları No. US20040268425 veya US20100143457'de açıklananların herhangi biri gibi çözünür PH20 hiyalüronidazlar yer alır, ayrıca DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen örnek çözünür beşeri PH20 hiyalüronidazlara bakınız.

Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler ayrıca bu alanda uzman olanlar tarafından bilinen veya burada açıklanan herhangi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin varyantlarını, örneğin herhangi bir hiyalüronidazı veya çözünür hiyalüronidazı, örneğin bir PH20'yi içerir. Örneğin hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler birincil dizisinde amino asit sübstitüsyonları, ilaveleri ve/veya silintileri gibi bir veya daha fazla varyasyon içerebilir. Bir hiyalüronan

ayrıştırıcı enzimin bir varyantı genellikle, varyasyonu içermeyen hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle karşılaştırıldığında en az veya yaklaşık %60, %70, %80, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya daha fazla dizi özdeşliği gösterir. Enzimin hiyalüronidaz aktivitesini, örneğin varyasyonu içermeyen bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin aktivitesinin en az veya yaklaşık %5, %10, %15, %20, %25, %30, %35, %40, %45, %50, %55, %60, %65, %70, %75, %80, %85, %90, %95'ini veya daha fazlasını koruması (bu alanda iyi bilinen ve burada açıklanan in vitro ve/veya in vivo tahlillerle ölçüldüğü üzere) koşuluyla hiyalüronan ayrıştırıcı enzime buradaki amaçlar için herhangi bir varyasyon dâhil edilebilir. Örneğin, bir polimere konjuge edilebilenler de dâhil olmak üzere örnek hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, DİZİ İD NO: 122-170'in herhangi birine en az veya yaklaşık %60, %70, %80, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya daha fazla dizi özdeşliği gösterenlerin herhangi biridir. Yukarıda açıklandığı gibi, bu PH20 varyantlarının örnekleri bilinmekte ve ABD Yayını No. US2013-0302275'te açıklanmaktadır.

Hiyalüronidazlar da dâhil olmak üzere hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin çeşitli formları hazırlanmış ve insanlar da dâhil olmak üzere hastalarda terapötik kullanım için onaylanmıştır. Örneğin hayvan türevli hiyalüronidaz terkipleri arasında saflaştırılmış bir küçükbaş hayvan testis hiyalüronidazı olan Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), bir büyükbaş hayvan testis hiyalüronidazı olan Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals) ve bir büyükbaş hayvan testis hiyalüronidazı olan Hydase™ (Prima Pharm Inc.) yer alır. Hylenex® (Halozyme Therapeutics) rHuPH20 olarak adlandırılan, PH20'nin nükleik asit kodlayıcı çözünür formlarını içeren genetik olarak değiştirilmiş Çin Hamsteri Yumurtalık (CHO) hücreleri tarafından üretilen bir beşeri rekombinant hiyalüronidazdır (örneğin bakınız: ABD Yayını No. US20040268425; ABD Patenti No. 7,767,429). Burada sunulan kombinasyonlarda ve kullanıma yönelik kombinasyonlarda herhangi bir hiyalüronidaz terkibinin kullanılabileceği takdir edilecektir (örneğin bakınız: ABD Patentleri No. 2,488,564, 2,488,565, 2,676,139, 2,795,529, 2,806,815, 2,808,362, 5,747,027 ve 5,827,721 ve Uluslararası PCT Yayını No. WO2005/118799; ABD Yayınları No. US20040268425 ; ABD Patenti No. 7,767,429; veya burada sunulanların herhangi biri).

Burada sunulan kombinasyonlarda kullanım için hiyalüronidaz enzimleri veya çözünür hiyalüronidaz enzimi, örneğin PH20 gibi örnek hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin sınırlandırıcı olmayan bir açıklaması aşağıda verilmektedir. Genellikle bu hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler arasında bir polimere konjuge edilenler yer alır.

a. Hiyalüronidazlar

Hiyalüronidazlar büyük bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler familyasının üyeleridir. Hiyalüronidazların üç genel sınıfı vardır: memeli tipi hiyalüronidazlar, bakteriyel hiyalüronidazlar ve sülükler, başka parazitler ve kabuklulardan gelen hiyalüronidazlar. Avrupa eşek arısı (DİZİ İD NO: 171 ve 172), bal arısı (DİZİ İD NO: 173), white-face hornet (Dolichovespula Maculata) (DİZİ İD NO: 174) ve kâğıt arısı (DİZİ İD NO: 175) gibi başka hiyalüronidazlar bilinmektedir. Burada sunulan bileşimler, kombinasyonlar ve kullanıma yönelik kombinasyonlarda bu enzimlerin herhangi biri kullanılabilir.

i. Memeli tipi hiyalüronidazlar

Memeli tipi hiyalüronidazlar (EC 3.2.1.35) hiyalüronanın β-1→4 glikozidik bağını tetrasakaritler ve heksasakaritler gibi çeşitli oligosakarit uzunluklarına hidrolize eden *endo-β-N-asetil*-heksozaminidazlardır. Bu enzimler hem hidrolitik hem transglikozidaz aktivitelere sahiptir ve hiyalüronanı ve kondroitin sülfatları (CS), genellikle C4-S ve C6-S'yi ayrıştırabilir. Bu tip hiyalüronidazlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla ineklerden (büyükbaş hayvan) (DİZİ İD NO: 163, 164 ve 176-178, ve DİZİ İD NO: 181-183'te verilen nükleik asit molekülleri), koyundan (*Ovis aries*) (DİZİ İD NO: 184-187, DİZİ İD NO: 188-190'da verilen nükleik asit molekülleri), domuzdan (DİZİ İD NO: 191-192), fareden (DİZİ İD NO: 165, 193-196), sıçandan (DİZİ İD NO: 166, 198-201), tavşandan (DİZİ İD NO: 167, 203), orangutandan (DİZİ İD NO: 205), sinomolgus maymunundan (DİZİ İD NO: 162, 206), kobaydan (DİZİ İD NO: 168, 197), şempanzeden (DİZİ İD NO: 159, 160 ve 204), Hint şebeğinden (DİZİ İD NO: 161, 202), tilkiden (DİZİ İD NO: 169, 170) olanlar ve beşeri hiyalüronidazlar (DİZİ İD NO: 122, 217-221) yer alır. Yukarıdaki hiyalüronidazlar arasında PH20 hiyalüronidazlar yer alır. Ayrıca BH55 hiyalüronidaz, ABD Patentleri No. 5,747,027 ve 5,827,721'de açıklandığı gibi bu tiptedir. Burada sunulan bileşimlerde, kombinasyonlarda ve kullanıma yönelik kombinasyonlardaki örnek hiyalüronidazlar çözünür hiyalüronidazlardır.

Memeli hiyalüronidazları, ağırlıklı olarak testis ekstraktlarında bulunan nötr aktif olanlar ve ağırlıklı olarak karaciğer gibi organlarda bulunan asit aktif olanlar gibi daha da bölünebilir. Örnek nötr aktif hiyalüronidazlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla küçükbaş hayvan (DİZİ İD NO: 185-187), büyükbaş hayvan (DİZİ İD NO: 177, 178) ve insan (DİZİ İD NO: 217) gibi türlerden elde edilen PH20 de dâhil olmak üzere PH20 yer alır. Beşeri PH20 (SPAM1 veya sperm yüzey proteini PH20 olarak da bilinir) genellikle

plazma membranına bir glikosilfosfatidil inozitol (GPI) çapası vasıtasıyla bağlıdır. Sperm-yumurta adhezyonunda doğal olarak rol oynar ve hiyalüronik asidi sindirerek spermin kümülüs hücreleri tabakasına girişine yardım eder.

Beşeri PH20'nin (veya SPAM1) yanı sıra beşeri genomda beş hiyalüronidaza benzer gen tanımlanmıştır: HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 ve HYALP1. HYALP1 bir psödo gendir ve HYAL3'ün (DİZİ İD NO: 220) bilinen substratların herhangi birine yönelik enzim aktivitesine sahip olduğu gösterilmemiştir. HYAL4 (DİZİ İD NO: 21'de verilen öncü polipeptit) bir kondroitinazdır ve hiyalüronana karşı az aktivite gösterir. HYAL1 (DİZİ İD NO: 218'de verilen öncü polipeptit) prototipik asit aktif enzimdir ve PH20 (DİZİ İD NO: 217'de verilen öncü polipeptit) prototipik nötr aktif enzimdir. HYAL1 ve HYAL 2 (DİZİ İD NO: 219'da verilen öncü polipeptit) gibi asit aktif hiyalüronidazlar genellikle nötr pH'de (yani pH 7) katalitik aktiviteden yoksundur. Örneğin HYAL1 pH 4.5'in üzerinde *in vitro* az katalitik aktiviteye sahiptir (Frost ve diğerleri (1997) Anal. Biochem. 251:263-269). HYAL2 *in vitro* spesifik aktivitesi çok düşük olan asit aktif bir enzimdir. Hiyalüronidaza benzer enzimler, beşeri HYAL2 ve beşeri PH20 gibi plazma membranına genellikle bir glikosilfosfatidil inozitol (GPI) çapasıyla bağlananlar (Danilkovitch-Miagkova ve diğerleri (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100(8):4580-4585) ve beşeri HYAL1 gibi genellikle çözünür olanlarla (Frost ve diğerleri (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1):10-15) karakterize edilebilir.

PH20

Diğer memeli hiyalüronidazlar gibi PH20 de hiyalüronik asidin β1→4 glikozidik bağını tetrasakaritler ve heksasakaritler gibi çeşitli oligosakarit uzunluklarına hidrolize eden bir endo-β-N-asetil-heksozaminidazdır. Hem hidrolitik hem transglikozidaz aktivitelere sahiptir ve hiyalüronik asidi ve C4-S ve C6-S gibi kondroitin sülfatları ayrıştırabilir. PH20 doğal olarak sperm-yumurta adhezyonunda rol oynar ve hiyalüronik asidi sindirerek spermin kümülüs hücreleri tabakasına girişine yardım eder. PH20 sperm yüzeyinde ve iç akrozomal membrana bağlı olduğu lizozom türevli akrozomda bulunur. Plazma membranı PH20'si, sadece nötr pH'de hiyalüronidaz aktivitesine sahiptir, iç akrozomal membran PH20'si ise hem nötr hem asit pH'de aktiviteye sahiptir. PH20 bir hiyalüronidaz olmanın yanı sıra, HA'nın yol açtığı hücre sinyalleri için bir reseptör ve oositi çevreleyen zona pellusida için bir reseptör gibi görünmektedir.

Öncü ve olgun formlar da dâhil olmak üzere örnek PH20 proteinleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla beşeri (DİZİ İD NO: 217'de verilen öncü polipeptit, DİZİ İD NO: 122'de verilen olgun polipeptit), şempanze (DİZİ İD NO: 159, 160 ve 204), Hint şebeği (DİZİ İD NO: 161, 202), büyükbaş hayvan (DİZİ İD NO: 164,163, 177, 178), tavşan (DİZİ İD NO: 167, 203), küçükbaş hayvan PH20 (DİZİ İD NO: 185-187), sinomolgus maymunu (DİZİ İD NO: 162, 206), kobay (DİZİ İD NO: 168, 197), sıçan (DİZİ İD NO: 166, 201), fare (DİZİ İD NO: 165, 196) ve tilki (DİZİ İD NO: 169, 170) PH20 polipeptitleri yer alır.

Büyükbaş hayvan PH20'si 553 amino asitli bir öncü polipeptittir (DİZİ İD NO: 177). Büyükbaş hayvan PH20'sinin beşeri PH20'yle hizalanması, ancak zayıf homoloji göstermekte olup, büyükbaş hayvan polipeptidinde bir GPI çapasının olmaması nedeniyle 470. amino asitten ilişkili karboksi terminallerine kadar birçok açıklık vardır (örneğin bakınız: Frost (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4:427-440). Aslında net GPI çapaları beşeri olanların yanı sıra birçok başka PH20 türünde öngörülmez. Dolayısıyla, küçükbaş hayvandan ve büyükbaş hayvandan üretilen PH20 polipeptitleri doğal olarak çözünür formlar olarak var olur. Büyükbaş hayvan PH20'si plazma membranına çok gevşek bağlı bir şekilde var olmasına rağmen, fosfolipaza duyarlı bir çapayla bağlı değildir (Lalancette ve diğerleri (2001) Biol Reprod. 65(2):628-636). Büyükbaş hayvan hiyalüronidazın bu benzersiz özelliği, çözünür büyükbaş hayvan testisi hiyalüronidaz enziminin klinik kullanım için bir ekstrakt olarak kullanımına izin vermiştir (Wydase®, Hyalase®).

Beşeri PH20 mRNA transkripti normal olarak N terminalde (1-35. amino asit kalıntısı pozisyonlarında) 35 amino asitli bir sinyal dizisi ve C terminalde (491-509. amino asit kalıntısı pozisyonlarında) 19 amino asitli bir glikosilfosfatidilinozitol (GPI) çapası bağlantı sinyal dizisi içeren 509 amino asitli bir öncü polipeptit (DİZİ İD NO: 217) üretmek için normal olarak translasyona tabi tutulur. Dolayısıyla olgun PH20 DİZİ İD NO: 122'de verilen 474 amino asitli bir polipeptittir. Öncü polipeptidin ER'e taşınmasının ve sinyal peptidinin çıkarılmasının ardından, C terminal GPI bağlantısı sinyal peptidi yarılarak GPI çapasının DİZİ İD NO: 217'de verilen öncü polipepidin 490. pozisyonuna karşılık gelen amino asit pozisyonunda yeni oluşan C terminal amino aside kovalent bağlantısını kolaylaştırır. Böylece DİZİ İD NO: 122'de verilen amino asit dizisine sahip 474 amino asitli GPI çapalı bir olgun polipeptit üretilir.

Beşeri PH20 nötr ve asit pH'de hiyalüronidaz aktivitesi gösterir. Bir yöne göre, beşeri PH20 genellikle bir GPI çapası vasıtasıyla plazma membranına bağlanan prototipik nötr

aktif hiyalüronidazdır. Başka bir yöne göre, PH20 nötr ve asit pH'de hiyalüronidaz aktivitesine sahip olduğu iç akrozomal membran üzerinde eksprese edilir. PH20'nin polipeptidin ayrı bölgelerinde, Peptit 1 ve Peptit 3 bölgelerinde iki katalitik yer içerdiği anlaşılmaktadır (Cherr ve diğerleri, (2001) Matrix Biology 20:515-525). Bulgular DİZİ İD NO: 122'de verilen olgun polipeptidin 107-137. amino asit pozisyonlarına ve DİZİ İD NO: 217'de verilen öncü polipeptidin 142-172. pozisyonlarına karşılık gelen, PH20'nin Peptit 1 bölgesinin, nötr pH'de enzim aktivitesi için gerekli olduğunu göstermektedir. Bu bölge içindeki 111. ve 113. pozisyonlardaki (DİZİ İD NO: 122'de verilen olgun pH20 polipeptidine karşılık gelir) amino asitler aktivite için önemli görünmektedir, çünkü amino asit ikamesiyle mutagenez, yabani tip PH20'yle karşılaştırıldığında sırasıyla %3 hiyalüronidaz aktivitesine veya saptanamayan hiyalüronidaz aktivitesine sahip PH20 polipeptitleri vermektedir (Arming ve diğerleri, (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814).

DİZİ İD NO: 122'de verilen olgun polipeptidin 242-262. amino asit pozisyonlarına ve DİZİ İD NO: 217'de verilen öncü polipeptidin 277-297. pozisyonlarına karşılık gelen Peptit 3 bölgesi, asidik pH'de enzim aktivitesi için önemli görünmektedir. Bu bölge içinde, olgun pH20 polipeptidinin 249 ve 252. pozisyonlarındaki amino asitler aktivite için elzem görünmektedir ve herhangi birinin mutagenezi aktiviteden esas itibarıyla yoksun bir polipeptit vermektedir (Arming ve diğerleri, (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814).

Katalitik yerlerin yanı sıra, PH20 bir hiyalüronan bağlama yeri içerir. Deneysel bulgular bu yerin DİZİ İD NO: 217'de verilen öncü polipeptidin 205-235. amino asit pozisyonlarına ve DİZİ İD NO: 122'de verilen olgun polipepidin 170-200. pozisyonlarına karşılık gelen, Peptit 2 bölgesinde bulunduğuna işaret etmektedir. Bu bölge hiyalüronidazlarda son derece korunmuştur ve heparin bağlama motifine benzer. 176. pozisondaki arginin kalıntısının (DİZİ İD NO: 122'de verilen olgun PH20 polipeptidine karşılık gelir) bir glisine mutasyonu, yabani tip polipeptidin hiyalüronidaz aktivitesinin ancak yaklaşık %1'ine sahip bir polipeptit verir (Arming ve diğerleri, (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814).

Beşeri PH20'de DİZİ İD NO: 217'de örneklenen polipeptidin N82, N166, N235, N254, N368, N393 ve S490 pozisyonunda, N ve O ile bağlı glikosilasyon yerleri de dâhil olmak üzere yedi potansiyel glikosilasyon yeri vardır. DİZİ İD NO: 217'nin 36 ila 464. amino asitleri asgari düzeyde aktif beşeri PH20 hiyalüronidaz sahasını içeriyor gibi göründüğü için, uygun hiyalüronidaz aktivitesi için S490'daki glikosilasyon yeri gerekli değildir. Beşeri PH20'de altı disülfür bağı vardır. DİZİ İD NO: 217'de örneklenen polipeptidin

sistein kalıntıları C60 ve C351 arasında ve C224 ve C238 arasında (sırasıyla DİZİ İD NO: 122'de verilen olgun polipeptidin C25 ve C316 ve C189 ile C303 kalıntılarına karşılık gelir) iki disülfür bağı vardır. DİZİ İD NO: 217'de örneklenen polipeptidin sistein kalıntıları C376 ve 387 arasında; C381 ve C435 arasında; C437 ve C443 arasında; ve C458 ve C464 arasında (sırasıyla DİZİ İD NO: 122'de verilen olgun polipeptidin kalıntıları C341 ve C352 arası; C346 ve C400 arası; C402 ve C408 arası; ve C423 ve C429 arasına karşılık gelir) dört disülfür bağı daha oluşur.

ii. Bakteriyel Hiyalüronidaz

Bakteriyel hiyalüronidazlar (EC 4.2.2.1 veya EC 4.2.99.1) hiyalüronanı ve çeşitli derecelerde kondroitin sülfatları ve dermatan sülfatları ayrıştırır. Bakterilerden izole edilen hiyalüronan liyazlar etki biçimleriyle hiyalüronidazlardan (başka kaynaklardan, örneğin hiyalüronoglukozaminidazlar, EC 3.2.1.35) farklıdır. Bunlar hiyalüronandaki N-asetil-beta-D-glukozamin ve D-glukuronik asit kalıntıları arasındaki β1→4 glikozidik bağının hidrolizinden çok bir eliminason reaksiyonunu katalize ederek, 3-(4-deoksi-β-D-gluk-4-enuronosil)-N-asetil-D-glukozamin tetra- ve heksasakaritler ve disakarit uç ürünleri veren endo-β-N-asetilheksozaminidazlardır. Reaksiyon indirgeyici olmayan uçlarında doymamış heksuronik asit kalıntıları olan oligosakaritlerin oluşumuyla sonuçlanır.

Burada sunulan bileşimlerde, kombinasyonlarda ve kullanıma yönelik kombinasyonlarda kullanım için bakterilerden elde edilen örnek hiyalüronidazlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, *Arthrobacter, Bdellovibrio, Clostridium, Micrococcus, Streptococcus, Peptococcus, Propionibacterium, Bacteroides* ve *Streptomyces* suşları da dâhil olmak üzere mikroorganizmalardaki hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler yer alır. Bu suşların ve enzimlerin spesifik örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla *Arthrobacter* türü (suş FB24) (DİZİ İD NO: 222), *Bdellovibrio bacteriovorus* (DİZİ İD NO: 223), *Propionibacterium acnes* (DİZİ İD NO: 224), *Streptococcus agalactiae* ((DİZİ İD NO: 225); 18RS21 (DİZİ İD NO: 226); serotip Ia (DİZİ İD NO: 227); ve serotip III (DİZİ İD NO: 228)), *Staphylococcus aureus* (suş COL (DİZİ İD NO: 229); suş MRSA252 (DİZİ İD NO: 230, 231); suş MSSA476 (DİZİ İD NO: 232); suş NCTC 8325 (DİZİ İD NO: 233); suş büyükbaş hayvan RF122 (DİZİ İD NO: 234, 235); ve suş USA300 (DİZİ İD NO: 236)), *Streptococcus pneumoniae* ((DİZİ İD NO: 237); suş ATCC BAA-255 / R6 (DİZİ İD NO: 238); ve serotip 2, suş D39 / NCTC 7466 (DİZİ İD NO: 239)), *Streptococcus pyogenes* (serotip M1 (DİZİ İD NO: 240); serotip M2, suş MGAS10270 (DİZİ İD NO:

241); serotip M4, suş MGAS10750 (DİZİ İD NO: 242); serotip M6 (DİZİ İD NO: 243); serotip M12, suş MGAS2096 (DİZİ İD NO: 244, 245); serotip M12, suş MGAS9429 (DİZİ İD NO: 246); ve serotip M28 (DİZİ İD NO: 247)); *Streptococcus suis* (DİZİ İD NO: 248-250); *Vibrio fischeri* (suş ATCC 700601/ ES114 (DİZİ İD NO: 251)) ve hiyalüronik asit için spesifik olan ve kondroitin veya kondroitin sülfatı yarmayan *Streptomyces hyaluronolyticus* hiyalüronidaz enzimi yer alır (Ohya, T. ve Kaneko, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198:607).

iii. Sülükler, başka parazitler ve kabuklulardan gelen hiyalüronidazlar

Sülükler, başka parazitler ve kabuklulardan gelen hiyalüronidazlar (EC 3.2.1.36) tetra- ve heksasakarit uç ürünleri üreten endo-β-glukuronidazlardır. Bu enzimler hiyalüronatta β-D-glukuronat ve N-asetil-D-glukozamin kalıntıları arasındaki 1→3-bağlarının hidrolizini katalize eder. Sülüklerden gelen örnek hiyalüronidazlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Hirudinidae (örneğin *Hirudo medicinalis),* Erpobdellidae (örneğin *Nephelopsis obscura* ve *Erpobdella punctata,),* Glossiphoniidae (örneğin *Desserobdella picta, Helobdella stagnalis, Glossiphonia complanata, Placobdella ornata* ve *Theromyzon* türü*)* ve Haemopidae'den *(Haemopis marmorata*) gelen hiyalüronidaz yer alır (Hovingh ve diğerleri (1999) Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 124(3):319-26). Sülük hiyalüronidazıyla aynı etki mekanizmasına sahip, bakterilerden gelen örnek bir hiyalüronidaz siyanobakteri *Synechococcus* türü, suş RCC307'den gelendir (DİZİ İD NO: 252).

b. Diğer hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler

Burada hiyalüronidaz familyasının yanı sıra başka hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler açıklanmaktadır. Örneğin hiyalüronanı yarma kabiliyetine sahip spesifik kondroitinazlar ve liyazları kapsayan enzimler kullanılabilir. Hiyalüronanı ayrıştırabilen örnek kondroitinazlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla kondroitin ABC liyaz (kondroitinaz ABC olarak da bilinir), kondroitin AC liyaz (kondroitin sülfat liyaz veya kondroitin sülfat eliminaz olarak da bilinir) ve kondroitin C liyaz yer alır. Sunulan bileşimler, kombinasyonlar ve usullerde kullanılmak üzere bu enzimlerin üretimi ve saflaştırılması için usuller bu alanda bilinmektedir (örneğin bakınız: ABD Patenti No. 6,054,569; Yamagata, ve diğerleri (1968) J. Biol. Chem. 243(7):1523-1535; Yang ve diğerleri (1985) J. Biol. Chem. 160(30):1849-1857).

Kondroitin ABC liyaz, kondroitin-sülfat ve dermatan sülfat tipi çeşitli glikozaminoglikanları ayrıştıran iki enzim içerir: kondroitin-sülfat-ABC endoliyaz (EC 4.2.2.20) ve kondroitin-sülfat-ABC eksoliyaz (EC 4.2.2.21) (Hamai ve diğerleri (1997) J Biol Chem. 272(14):9123-30). Kondroitin sülfat, kondroitin-sülfat proteoglikan ve dermatan sülfat kondroitin-sülfat-ABC endoliyaz için tercih edilen substratlardır, ama enzim daha düşük bir oranda hiyalüronan üzerinde de etki yapabilir. Kondroitin-sülfat-ABC endoliyaz kondroitin-sülfat ve dermatan-sülfat tipi çeşitli glikozaminoglikanları ayrıştırarak, sonunda Δ4-doymamış tetra- ve disakaritlere ayrışan farklı büyüklüklerde Δ4-doymamış oligosakaritlerin bir karışımını üretir. Kondroitin-sülfat-ABC eksoliyaz aynı substrat spesifitesine sahiptir, ama hem polimerik kondroitin sülfatların hem de bunların kondroitin-sülfat-ABC endoliyaz tarafından üretilen oligosakarit fragmanlarının indirgeyici olmayan uçlarından disakarit kalıntılarını uzaklaştırır (Hamai, A. ve diğerleri (1997) J. Biol. Chem. 272:9123-9130). Örnek kondroitin-sülfat-ABC endoliyazlar ve kondroitin-sülfat-ABC eksoliyazlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla *Proteus vulgaris* ve *Flavobacterium heparinum*'dan elde edilenler yer alır (*Proteus vulgaris* kondroitin-sülfat-ABC endoliyaz DİZİ İD NO: 253'te verilmektedir (Sato ve diğerleri (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1):39-46).

Kondroitin AC liyaz (EC 4.2.2.5) kondroitin sülfatlar A ve C, kondroitin ve hiyalüronik asit üzerinde etkilidir, ama dermatan sülfat (kondroitin sülfat B) üzerinde etkili değildir. Bakterilerden elde edilen örnek kondroitinaz AC enzimleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla sırasıyla DİZİ İD NO: 254 ve 255'te verilen *Flavobacterium heparinum* ve *Victivallis vadensis*'ten ve *Arthrobacter aurescens*'ten elde edilenler yer alır (Tkalec ve diğerleri (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1):29-35; Ernst ve diğerleri (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5):387-444).

Kondroitinaz C kondroitin sülfat C'yi yararak, tetrasakarit artı bir doymamış 6 sülfatlı disakarit (delta Di-6S) üretir. Ayrıca hiyalüronik asidi yararak doymamış sülfatsız disakarit (delta Di-OS) üretir. Bakterilerden elde edilen örnek kondroitanaz C enzimleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla *Streptococcus* ve *Flavobacterium*'dan elde edilenler yer alır (Hibi ve diğerleri (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48(2):121-4; Michelacci ve diğerleri (1976) J. Biol. Chem. 251:1154-8; Tsuda ve diğerleri (1999) Eur. J. Biochem. 262:127-133).

c. Çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler (örneğin çözünür PH20)

Burada sunulan bileşimlerde, kombinasyonlarda ve kullanıma yönelik kombinasyonlarda, çözünür hiyalüronidazlar da dâhil olmak üzere çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler bulunmaktadır. Çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler arasında ekspresyon üzerine hücrelerden (örneğin CHO hücresi) salgılanan ve çözünür formda bulunan hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin herhangi biri yer alır. Bu enzimler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla insan dışı hayvan çözünür hiyalüronidazları ve beşeri hiyalüronidazlar, örneğin Hyal1, büyükbaş hayvan PH20'si, küçükbaş hayvan PH20'si de dâhil olmak üzere çözünür hiyalüronidazlar ve çözünür olmak üzere modifiye edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin herhangi biri ve bunların alelik varyantları v ebaşka varyantları yer alır. Örneğin bir GPI çapası içeren hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler C terminal budama ve GPI çapasının tamamının veya bir bölümünün çıkarılmasıyla çözünür hale getirilebilir. Bir örnekte, bir çözünür hiyalüronidaz, normal olarak bir GPI çapasıyla membrana bağlı olan beşeri hiyalüronidaz PH20'nin budandığı ve C terminalde GPI çapasının tamamının veya bir bölümünün yok olduğu C terminal olarak budanmış bir beşeri PH20'dir.

Çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler arasında ayrıca nötr aktif ve asit aktif hiyalüronidazlar yer alır. Nötr aktif ve asit aktif hiyalüronidazlar sınırlandırıcı olmamak koşuluyla uygulamanın ardından enzim aktivitesinin istenen seviyesi ve/veya uygulama yeri gibi faktörlere göre seçilebilir. Özel bir örnekte, buradaki bileşimlerde, kombinasyonlarda ve kullanıma yönelik kombinasyonlarda kullanım için hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bir çözünür nötr aktif hiyalüronidazdır.

Bu çözünür formlar arasında, hiyalüronidazın çözünür olması (ekspresyon üzerine salgılanır) ve hiyalüronidaz aktivitesini koruması koşuluyla, C terminal GPI çapasının tamamından veya bir bölümünden ari olan budanmış formlar yer alır (örneğin bakınız: ABD Patentleri No. 8,431,380 ve 7,767,429). Bu formlar aynı zamanda, bir hücrede eksprese olduğunda sinyal peptidinden ari olan olgun formlardır. Örnek hiyalüronidazlar arasında herhangi bir türden bir PH20'nin çözünür formları, örneğin DİZİ İD NO: 122, 159, 160, 161-170, 177, 178, 185-187, 196, 197, 203, 206, 201, 202, 204 ve 217'nin herhangi birinin bir PH20'sinin çözünür bir formu yer alır. Çözünür hiyalüronidazlar arasında ayrıca hiyalüronidaz aktivitesi gösteren, DİZİ İD NO: 122, 159, 160, 161-170, 177, 178, 185-187, 196, 197, 203, 206, 201, 202, 204, 217'de verilen herhangi bir türden PH20'lerin herhangi birinin varyantlarının çözünür formları veya bunların budanmış formları yer alır. Varyantlar arasında DİZİ İD NO: 122, 159, 160, 161-170, 177, 178, 185-187, 196, 197, 203, 206, 201, 202, 204 veya 217'nin herhangi birine %60, %70, %80,

%90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip polipeptitler ve bunların olgun (örneğin sinyal dizisi içermeyen) veya çözünür budanmış formları yer alır. Amino asit varyantları koruyucu ve koruyucu olmayan mutasyonlar içerir. Yukarıda açıklananların veya bu alanda uzman olanlar tarafından bilinenlerin herhangi biri gibi, bir hiyalüronidazın aktivitesi için önemli veya başka türlü gerekli olan kalıntıların genellikle sabit olduğu ve değiştirilemediği takdir edilecektir. Bunlar arasında örneğin aktif yer kalıntıları yer alır. Dolayısıyla örneğin bir beşeri PH20 polipeptidinin veya bunun çözünür formunun 111, 113 ve 176. amino asit kalıntıları (DİZİ İD NO: 122'de verilen olgun PH20 polipeptidindeki kalıntılara karşılık gelir) genellikle sabittir ve değişmez. Glikosilasyonu ve doğru katlanma için gerekli olan disülfür bağlarının oluşumunu sağlayan başka kalıntılar da sabit olabilir. 204'e (tam uzunlukta beşeri PH20'ye ait) karşılık gelen kalıntının prolinle (P) değiştirilmesini içerenler gibi denatürasyon koşulları altında stabilitesi artan PH20 enzimlerini kapsayan çözünür PH20 enzimlerinin modifiye formları da bilinmektedir (bakınız: Yayın No. US-2013-0302275).

Bazı durumlarda, çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzim normal olarak GPI çapalıdır (örneğin beşeri PH20 gibi) ve C terminalde budamayla çözünür hale getirilir. Bu budama GPI çapa bağlantı sinyal dizisinin tamamını uzaklaştırabilir veya GPI çapa bağlantı sinyal dizisinin sadece bir kısmını uzalaştırabilir. Ancak elde edilen polipeptit çözünür bir polipeptittir. Çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin GPI çapa bağlantı sinyal dizisinin bir bölümünü koruduğu durumlarda, polipeptidin çözünür olması koşuluyla, GPI çapa bağlantı sinyal dizisinin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veya daha fazla amino asit kalıntısı korunabilir. GPI çapasının bir veya daha fazla amino asidini içeren polipeptitler uzatılmış çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler olarak adlandırılır. Bu alanda uzman olanlar, bir polipeptidin GPI çapalı olup olmadığını bu alanda iyi bilinen usulleri kullanarak belirleyebilirler. Bu usuller arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla GPI çapası bağlantı sinyal dizisinin ve ω yerinin varlığını ve konumunu öngörmeye yönelik bilinen algoritmaların kullanılması ve fosfatidilinozitole spesifik fosfolipaz C (PI-PLC) veya D (PI-PLD) ile sindirimden önce ve sonra çözünürlük analizleri yapılması yer alır.

Uzatılmış çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, elde edilen polipeptidin çözünür olacağı ve GPI çapası bağlantı sinyal dizisinden bir veya daha fazla amino asit kalıntısı içereceği şekilde herhangi bir doğal olarak GPI çapalı hiyalüronan ayrıştırıcı enzimde C terminal budamalar yapılarak üretilebilir (örneğin bakınız: ABD Yayımlanmış Patent Başvurusu No. US20100143457). C terminal olarak budanmış, ama GPI çapası bağlantı

sinyal dizisinin bir bölümünü koruyan uzatılmış çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla primat kökenli uzatılmış çözünür PH20 (esPH20) polipeptitleri, örneğin beşeri ve şempanze esPH20 polipeptitleri yer alır. Örneğin esPH20 polipeptitleri, DİZİ İD NO: 122, 179, 180 veya 204 veya 217'de verilen olgun veya öncü polipeptitlerin veya bunların aktif fragmanı da dâhil olmak üzere başka varyantlarının C terminal budanmasıyla oluşturulabilir, burada elde edilen polipeptit çözünür bir polipeptittir ve GPI çapası bağlantı sinyal dizisinden bir veya daha fazla amino asit kalıntısını korur. Varyantlar hiyalüronidaz aktivitesini koruyan, DİZİ İD NO: 122, 170, 180 veya 204 veya 217'nin herhangi birine %60%70, %80, %90, %91, %92, %93, %94, %95 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip polipeptitleri içerir. Burada sunulan esPH20 polipeptitleri, elde edilen esPH20 polipeptidinin çözünür olması ve GPI çapası bağlantı sinyal dizisinden 1 veya daha fazma amino asit kalıntısını koruması koşuluyla DİZİ İD NO: 122, 179, 180 veya 204 veya 217'de verilen bir diziye sahip bir polipeptit gibi, yabani tip polipeptitle karşılaştırıldığında 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veya daha fazla amino asitle C terminal olarak budanmış olabilir.

Tipik olarak, buradaki bileşimlerde, kombinasyonlarda ve kullanıma yönelik kombinasyonlarda kullanım için, bir çözünür beşeri hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir çözünür beşeri PH20 kullanılır. Başka hayvanlardan elde edilen PH20 gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler kullanılabilmekle birlikte, bu terkipler hayvansal proteinler oldukları için potansiyel olarak immünojeniktir. Örneğin, hastaların önemli bir oranı, alınan gıdalara sekonder önceden duyarlılaşma gösterir ve bunlar hayvansal proteinler olduğu için bütün hastalarda daha sonra bir duyarlılaşma riski söz konusudur. Dolayısıyla beşeri olmayan terkipler kronik kullanım için uygun olmayabilir. Beşeri olmayan terkipler isteniyorsa, bu polipeptitlerin azaltılmış immünojenisiteye sahip olacak şekilde hazırlanabileceği düşünülmektedir. Bu modifikasyonlar bu alanda uzman olanların becerileri dâhilindedir ve bunlar arasında örneğin molekül üzerindeki bir veya daha fazla antijenik epitopun çıkarılması ve/veya değiştirilmesi yer alabilir.

Buradaki kullanıma yönelik kombinasyonlarda kullanılan hiyalüronidazlar da (örneğin PH20) dâhil olmak üzere hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler rekombinant olarak üretilebilir veya doğal kaynaklardan, örneğin testis ekstraktlarından saflaştırılabilir veya kısmen saflaştırılabilir. Rekombinant hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler de dâhil olmak üzere rekombinant proteinlerin üretimi için usuller burada başka yerlerde sunulmakta ve bu alanda iyi bilinmektedir.

i. Çözünür beşeri PH20

Çözünür beşeri PH20 bir çözünür hiyalüronidaz örneğidir. Rekombinant beşeri PH20'nin çözünür formları üretilmiştir ve burada açıklanan bileşimlerde, kombinasyonlarda ve kullanıma yönelik kombinasyonlarda kullanılabilir. PH20'nin bu çözünür formlarının üretimi ABD Yayımlanmış Patent Başvuruları No. US20040268425; US20050260186, US20060104968, US20100143457 ve Uluslararası PCT Yayını No. WO2009111066'da açıklanmaktadır. Örneğin çözünür PH20 polipeptitleri arasında, DİZİ İD NO: 217 veya 122'deki bir amino asit dizisini içeren veya DİZİ İD NO: 217 veya 122'de bulunan bir amino asit dizisine en az %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97 veya %98 dizi özdeşliğine sahip olan, hiyalüronidaz aktivitesini koruyan ve çözünür olan C terminal olarak budanmış varyant polipeptitler yer alır. Bu polipeptitler arasında GPI çapası bağlantı sinyal dizisinin tamamından veya bir bölümünden ari olan çözünür PH20 polipeptitler yer alır.

GPI çapasının en az bir amino asidini içeren uzatılmış çözünür PH20 (esPH20) polipeptitleri de dâhildir. Dolayısıyla, ER'de proteinin C terminaline jovalent olarak bağlı bir GPI çapasına sahip olmak ve plazma membranının hücre dışı yaprağına çapalı olmak yerine, bu polipeptitler salgılanır ve çözünebilir. C terminal olarak budanmış PH20 polipeptitleri, DİZİ İD NO: 217 veya 122'de verilen bir diziyi haiz tam uzunlukta bir yabani tip polipeptit gibi tam uzunlukta yabani tip polipeptitle veya bunun alelik veya tür varyantları veya başka varyantlarıyla karşılaştırıldığında 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 veya daha fazla amino asitle C terminal olarak budanmış olabilir.

Beşeri PH20'ninin çözünür formları arasında genel olarak, DİZİ İD NO: 217'de verilen 34-464. amoni asitleri içerenler yer alır. Örneğin çözünür formlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, DİZİ İD NO: 217'de verilen amino asit dizisinin 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 veya 500. C terminal amino asit kalıntısına sahip, DİZİ İD NO: 217'de verilen beşeri PH20'nin C terminal olarak budanmış polipeptitleri, bunların olgun formları veya bunlara en az %85 özdeşlik gösteren polipeptitler yer alır. Örneğin memeli hücrelerinde eksprese edildiğinde, 35 amino asitli N-terminal sinyal dizisi işleme sırasında yarılır ve proteinin olgun formu üretilir ve salgılanabilir. Dolayısıyla, olgun çözünür polipeptitler DİZİ İD NO: 217'nin 36 ila 467,

468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482 ve 483. amino asitlerini içerir. Tablo 4'te öncü ve olgun formları da dâhil olmak üzere örnek C terminal olarak budanmış çözünür PH20 polipeptitlerinin sınırlandırıcı olmayan örnekleri verilmektedir. Aşağıdaki Tablo 4'te, öncü ve olgun polipeptitlerin uzunluğu (amino asitler olarak) ve C terminal olarak budanmış PH20 proteinlerinin öncü ve olgun polipeptitlerinin örnek amino asit dizilerinin verildiği dizi tanıtıcısı (DİZİ İD NO) verilmektedir. Tablo 4'e karşılaştırma için yabani tip PH20 polipeptidi de dâhil edilmiştir. Özellikle, örnek çözünür hiyalüronidazlar, DİZİ İD NO: 123-128'de verilenler gibi 442, 443, 444, 445, 446 veya 447 amino asit uzunluğunda olan çözünür beşeri PH20 polipeptitleri veya bunların alelik veya tür varyantları veya başka varyantlarıdır.

Tablo 4. Örnek C terminal olarak budanmış PH20 polipeptitleri

Öncü			**Olgun**		
DİZİ İD NO: 217 amino asitleri	**uzunluk (aa)**	**DİZİ İD NO**	**DİZİ İD NO: 217 amino asitleri**	**uzunluk (aa)**	**DİZİ İD NO**
1-509*	509	217	36-509**	474	122
1-500	500	216	36-500	465	152
1-499	499	215	36-499	464	131
1-498	498	214	36-498	463	153
1-497	497	213	36-497	462	132
1-496	496	212	36-496	461	154
1-495	495	211	36-495	460	133
1-494	494	210	36-494	459	155
1-493	493	209	36-493	458	134
1-492	492	208	36-492	457	156
1-491	491	207	36-491	456	135
1-490	490	281	36-490	455	137
1-489	489	280	36-489	454	136
1-488	488	279	36-488	453	157
1-487	487	278	36-487	452	138
1-486	486	277	36-486	451	158

Tablo 4. Örnek C terminal olarak budanmış PH20 polipeptitleri					
Öncü			**Olgun**		
DİZİ İD NO: 217 amino asitleri	**uzunluk (aa)**	**DİZİ İD NO**	**DİZİ İD NO: 217 amino asitleri**	**uzunluk (aa)**	**DİZİ İD NO**
1-485	485	276	36-485	450	139
1-484	484	275	36-484	449	140
1-483	483	274	36-483	448	130
1-482	482	273	36-482	447	123
1-481	481	272	36-481	446	124
1-480	480	271	36-480	445	125
1-479	479	270	36-479	444	126
1-478	478	269	36-478	443	127
1-477	477	268	36-477	442	128
1-476	476	267	36-476	441	141
1-475	475	266	36-475	440	142
1-474	474	265	36-474	439	143
1-473	473	264	36-473	438	144
1-472	472	263	36-472	437	145
1-471	471	262	36-471	436	146
1-470	470	261	36-470	435	147
1-469	469	260	36-469	434	148
1-468	468	259	36-468	433	149
1-467	467	258	36-467	432	129
1-466	466	257	36-466	431	150
1-465	465	256	36-465	430	151
* Yabani tip öncü PH20					
** Yabani tip olgun PH20					

Örneğin, PH20'nin çözünür formları arasında, DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen amino asit dizisine veya DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen bir amino asit dizisine en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliği gösteren bir amino asit dizisine sahip ve çözünebilen ve hiyalüronidaz aktivitesini koruyan polipeptitler yer alır.

Beşeri PH20 (örneğin bir çözünür beşeri PH20) gibi PH20 varyantları bilinmekte ve ABD yayımlanmış başvuru No. US2013/0302275'te açıklanmaktadır. ABD yayımlanmış başvuru US2013/0302275'te açıklanan herhangi bir PH20 varyantı burada sunulan kombinasyon terapisinde kullanım için bir çözünür PH20 polipeptidi içine dâhil edilebilir. Bu varyantlar arasında, bir denatürasyon koşuluna (örneğin bir fenolik koruyucu) arttırılmış direnç veya artmış aktivite gösterenler yer alır. Böyle bir polipeptidin bir örneği, DİZİ İD NO:122'de verilen tam uzunlukta beşeri PH20'de veya DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen bir çözünür beşeri PH20'de belirtilen amino asit dizisine referansla F204P, V58K veya V58R amino asit ikamesini içeren bir çözünür beşeri PH20'dir.

Genellikle PH20'nin çözünür formları, polipeptidin aktiviteyi korumasını sağlamak için doğru N-glikosilasyonu kolaylaştıran protein ekspresyon sistemleri kullanılarak üretilir, çünkü glikosilasyon katalitik akitvite ve hiyalüronidazların stabilitesi için önemlidir. Bu hücreler arasında örneğin Çin Hamsteri Yumurtalık (CHO) hücreleri (örneğin DG44 CHO hücreleri) yer alır.

ii. rHuPH20

Beşeri PH20'nin rekombinant çözünür formları üretilmiştir ve burada sunulan bileşimlerde, kombinasyonlarda ve kullanıma yönelik kombinasyonlarda kullanılabilir. Rekombinant beşeri PH20'nin bu çözünür formlarının üretimi örneğin ABD Yayınlanmış Patent Başvuruları No. US20040268425; US 20050260186; US20060104968; US20100143457; ve Uluslararası PCT Başvurusu No. WO2009111066'da açıklanmaktadır. Bu polipeptitlerin örnekleri, 1-482. amino asitleri (DİZİ İD NO: 273'te verilen) kodlayan bir nükleik asit molekülünün ekspresyonuyla üretilenlerdir. Böyle bir örnek nükleik asit molekülü DİZİ İD NO: 5'te verilmektedir. Translasyon sonrası işlem, 35 amino asitli sinyal dizisini uzaklaştırarak, 447 amino asitli bir çözünür rekombinant beşeri PH20'yi (DİZİ İD NO: 123) bırakır. Kültür ortamında üretildiği için C terminalde heterojenite vardır, dolayısıyla rHuPH20 olarak adlandırılan ürün çeşitli miktarlarda DİZİ

İD NO: 123-128'in herhangi birini veya daha fazlasını içerebilen bir karışımı ihtiva eder. Tipik olarak, rHuPH20, CHO hücreleri (örneğin DG44 CHO hücreleri) gibi, aktiviteyi korumak için doğru N-glikosilasyonu kolaylaştıran hücrelerde üretilir.

d. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin glikosilasyonu

Hiyalüronidazlar da dâhil olmak üzere bazı hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin N ile bağlı ve O ile bağlı glikosilasyon da dâhil olmak üzere glikosilasyonu bunların katalitik aktivitesi ve stabilitesi için önemli olabilir. Bir glikoproteini modifiye eden glikan tipinin değiştirilmesinin bir proteinin antijenisitesi, yapısal katlanması, çözünürlüğü ve stabilitesi üzerinde dramatik etkileri olabilmekle birlikte, enzimlerin çoğunun optimal enzim ativitesi için glikosilasyonu gerektirdiği düşünülmemektedir. Bazı hiyalüronidazlar için, N ile bağlı glikosilasyonun uzaklaştırılması hiyalüronidaz aktivitesinin hemen hemen tamamen yitirilmesiyle sonuçlanabilir. Dolayısıyla bu tür hiyalüronidazlar için N-ile bağlı glikanların varlığı aktif bir enzim oluşturmak için kritiktir.

N ile bağlı oligosakaritlerin birkaç ana tipi vardır (oligomanoz, kompleks, hibrit, sülfatlı), bunların hepsi -Asn-Xaa-Thr/Ser-dizileri (burada Xaa Pro değildir) içine giren Asn kalıntılarının amid azotu vasıtasıyla bağlı (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc- çekirdeklerine sahiptir. Koagülasyon proteini C için bir -Asn-Xaa-Cys yerinde glikosilasyon bildirilmiştir. Bazı durumlarda, bir hiyalüronidaz gibi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim N-glikozidik ve O-glikozidik bağlar içerebilir. Örneğin PH20 N ile bağlı oligosakaritlerin yanı sıra O ile bağlı oligosakaritlere sahiptir. DİZİ İD NO: 217'de örneklenen beşeri PH20'de N82, N166, N235, N254, N368, N393'te altı potansiyel N ile bağlı glikosilasyon vardır. Amino asit kalıntıları N82, N166 ve N254 kompleks tipte glikanlar tarafından işgal edilir, amino asit kalıntıları N368 ve N393 ise yüksek manoz tipi glikanlar tarafından işgal edilir. Amino asit kalıntısı N235 yaklaşık olarak %80 yüksek manoz içerikli tipte glikanlar ve %20 kompleks tipte glikanlar tarafından işgal edilir. Yukarıda belirtildiği gibi, S490'da O ile bağlı glikosilasyon hiyalüronidaz aktivitesi için gerekli değildir.

Bazı örneklerde, sunulan bileşimler, kombinasyonlar ve/veya kullanıma yönelik kombinasyonlarda kullanım için hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, glikosilasyon yerlerinin birinde veya hepsinde glikosile edilir. Örneğin, beşeri PH20 veya bunun bir çözünür formu için, DİZİ İD NO: 217'nin amino asitleri N82, N166, N235, N254, N368 ve N393'e karşılık gelen N-glikosilasyon yerlerinin 2, 3, 4, 5 veya 6'sı glikosile edilir. Başka örneklerde, DİZİ İD NO: 217'nin amino asitleri N82, N166, N235, N254, N368 ve N393'e

karşılık gelen N-glikosilasyon yerlerinin 3, 4, 5 veya 6'sı glikosile edilir. Tipik olarak, en azından 235, 368 ve 393 kalıntıları glikosile edilir. Glikosile edilmiş amino asit kalıntıları asgari olarak bir N-asetilglikozamin kısmı içerir.

Bazı örneklerde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler bir veya daha fazla doğal glikosilasyon yerinde glikosile edilir. Başka örneklerde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, bir veya daha fazla ek yerde polipeptidin glikosilasyonunu sağlamak için bir veya daha fazla doğal olmayan glikosilasyon yerinde modifiye edilir. Bu örneklerde, ek şeker kısımlarının bağlanması, molekülün, artmış yarılanma ömrü ve/veya artmış aktivite gibi farmakokinetik özelliklerini geliştirebilir.

e. Sürekli veya Kontrollü Salım Formülasyonları ve Çözünür Hiyalüronidazları Kodlayan Vektörler

Bu alanda uzman olanlar, hiyalüronidazlar gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin serum yarılanma ömrünü arttırmak için çeşitli stratejileri bilmektedirler, bu artış hiyalüronidazların sistemik uygulaması için avantajlıdır. Genellikle, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim Pegilasyon veya siyalasyonla olduğu gibi modifiye edilir. Başka stratejiler de kullanılabilir. Bunlar arasında, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin sürekli salım için, örneğin hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin zamanlı salımını veya geciktirilmiş salımını sağlayabilen lipozomlar da dâhil olmak üzere veziküller içinde formüle edilmesi ve/veya tümörde salım için tümöre hedeflenmesi yer alır. Çözünü hiyalüronidazlar gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin bu tür formülasyonlarının örnekleri ABD Yayını US-2013-0251786-A1'de ve Uluslararası PCT başvurusu Yayın No. WO 2012/109387'de açıklananlardır. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler *in vivo* ekspresyon için ekspresyon vektörleri içinde, özellikle tümör hücrelerinde ekspresyon için tümörü hedefleyen veya onkolitik vektörler içinde de kodlanabilir (örneğin bakınız: ABD Patenti No. 8,450,470 ve Yayın No. US-2011-0152359-A1; ayrıca bakınız. ABD Yayını No. US- 2012-0148535). Burada kullanım için kombinasyonlar bir kontrol noktası inhibitörüyle kombinasyon terapisi için bir hastaya uygulanabilen veziküler formülasyonlarla ve/veya bir çözünür hiyalüronidazı kodlayan ekspresyon vektörleriyle uygulanabilir. Sürekli salım formülasyonları, burada açıklananların herhangi biri, özellikle anti-PD-L1 ve anti-CTLA4 gibi kontrol noktası inhibitör antikorları dâhil olmak üzere kontrol noktası inhibitörü içermek üzere de formüle edilebilir.

i. Modifiye (Polimere Konjuge) Edilmiş Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzimler

Polietilen glikol (PEGilasyon kısmı (PEG)) gibi polimerik moleküllerin hiyalüronidazlar gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlere kovalent olarak veya başka stabil bağlanması (konjugasyon) elde edilen hiyalüronan ayrıştırıcı enzim-polimer bileşimine yararlı özellikler verir. Bu özellikler arasında arttırılmış biyouyumluluk, bir hastada kanda, hücrelerde ve/veya başka dokularda proteinin (ve enzimatik aktivitenin) yarılanma ömrünün uzatılması, proteinin proteazlardan ve hidrolizden etkili bir şekilde korunması, arttırılmış biyodağılım, geliştirilmiş farmakokinetik ve/veya farmakodinamik ve arttırılmış suda çözünürlük yer alır.

Hiyalüronidaz gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzime konjuge edilebilen örnek polimerler arasında polyoller (yani poli-OH), poliaminler (yani poli-NH_2) ve polikarboksil asitler (yani poli-COOH) gibi doğal ve sentetik homopolimerler ve ayrıca heteropolimerler, yani bir veya daha fazla farklı bağlama grubu, örneğin bir hidroksil grubu ve amin grupları içeren polimerler yer alır. Uygun polimerik moleküllerin örnekleri arasında polialkilen oksitler (PAO), örneğin polietilen glikoller (PEG), metoksipolietilen glikoller (mPEG) ve polipropilen glikoller de dâhil olmak üzere polialkilen glikoller (PAG), PEG-glisidil eterler (Epox-PEG), PEG-oksikarbonilimidazol (CDI-PEG) dallanmış polietilen glikoller (PEG'ler) polivinil alkol (PVA), poli(etilenimin) (PEI), doğrusal poliamidoaminler, poliakrilamid (PAAm), polidimetilakrilamid (PDAAm), polivinil alkol (PVA), polikarboksilatlar, polivinilpirolidon (PVP), poli-D,L-amino asitler, polietilen-ko-maleik asit anhidrür, polistiren-ko-maleik asit anhidrür, karboksimetil-kitosan, dekstrin, dekstranlar da dâhil olmak üzere dekstranlar, heparin, homolog albümin, metilselüloz, karboksimetilselüloz, etilselüloz, hidroksietilselüloz, karboksietilselüloz ve hidroksipropilselüloz da dâhil olmak üzere selülozlar, kitosan hidrolizatları, hidroksietil-nişastalar ve hidroksipropil-nişastalar gibi nişastalar, glikojen, agarozlar ve bunların türevleri, guar zamkı, pullulan, inülin, ksantan zamkı, karagenan, pektin, alginik asit hidrolizatları ve biyopolimerler yer alır.

Tipik olarak polimerler, dekstran ve pullulan gibi polisakaritlerle karşılaştırıldığında çapraz bağlanabilen az sayıda reaktif gruba sahip olan polietilen oksitler gibi polialkilen oksitler (PAO), örneğin PEG, tipik olarak mPEG'dir. Tipik olarak polimerler, nispeten basit bir kimya kullanılarak hiyalüronidaz gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlere (örneğin proteinin

yüzeyi üzerindeki bağlanma gruplarına) kovalent olarak konjuge edilebilen (m)polietilen glikol (mPEG) gibi toksik olmayan polimerik moleküllerdir.

Terapötiklerin PEGilasyonunun proteolize direnci arttırdığı, plazma yarılanma ömrünü arttırdığı ve antijenisite ve immünojenisiteyi azalttığı bildirilmiştir. PEGilasyon metodolojilerinin örnekleri bu alanda bilinmektedir (örneğin bakınız: Lu ve Felix, Int. J. Peptide Protein Res., 43:127-138, 1994; Lu ve Felix, Peptide Res., 6:140-6, 1993; Felix ve diğerleri, Int. J. Peptide Res., 46:253-64, 1995; Benhar ve diğerleri, J. Biol. Chem., 269: 13398-404, 1994; Brumeanu ve diğerleri, J Immunol., 154:3088-95, 1995; ayrıca bakınız: Caliceti ve diğerleri (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10):1261-77 ve Molineux (2003) Pharmacotherapy 23 (8 Pt 2):3S-8S). PEGilasyon *in vivo* nükleik asit moleküllerinin tatbikinde de kullanılabilir. Örneğin adenovirüs PEGilasyonu stabiliteyi ve gen transferini arttırabilir (örneğin bakınız: Cheng ve diğerleri (2003) Pharm. Res. 20(9):1444-51).

Hiyalüronidazlar da dâhil olmak üzere hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlere bağlanmak için uygun polimerik moleküller arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla polietilen glikol (PEG) ve PEG türevleri, örneğin metoksi-polietilen glikoller (mPEG), PEG-glisidil eterler (Epox-PEG), PEG-oksikarbonilimidazol (CDI-PEG), dallanmış PEG'ler ve polietilen oksit (PEO) yer alır (örneğin bakınız: Roberts ve diğerleri, Advanced Drug Delivery Review (2002) 54: 459-476; Harris ve Zalipsky, S (ed.) "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar ve diğerleri, J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 3(1):125-136, 2000; Harris, (2003) Nature Reviews Drug Discovery 2:214-221; ve Tsubery, (2004) J Biol. Chem 279(37):38118-24). Polimerik molekül tipik olarak yaklaşık 3 kDa ila yaklaşık 60 kDA aralığında bir molekül ağırlığına sahip olabilir. Bazı düzenlemelerde, bir hiyalüronidaz, örneğin bir PH20 gibi bir proteine konjuge edilen polimerik molekülün molekül ağırlığı (yaklaşık) 5 ila 60 kDa arasında, örneğin en az veya yaklaşık en az veya 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 kDa veya 60 kDa'dan fazladır.

PEGillenmiş Çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzim

Buradaki kombinasyonlarda ve kullanıma yönelik kombinasyonlarda kullanılan hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, bir PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş çözünür hiyalüronan ayrıştırıcı enzim olabilir. Bir örnekte, bir PEGillenmiş çözünür hiyalüronidaz, örneğin PEGillenmiş PH20'dir. Polipeptitleri bir PEG veya PEG türevini kovalent olarak bağlayarak (konjugasyon) modifiye etmenin (yani "PEGilasyon")

çeşitli usulleri bu alanda bilinmektedir (örneğin bakınız: U.S. 2006/0104968; U.S. 5,672,662; U.S. 6,737,505; ve U.S. 2004/0235734). PEGilasyon teknikleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla özel bağlayıcılar ve bağlama kimyaları (örneğin bakınız: Roberts ve diğerleri, Adv. Drug Deliv. Rev. 54:459-476, 2002), birden fazla PEG kısmının tek bir konjugasyon yerine bağlanması (örneğin dallanmış PEG'ler kullanılarak; örneğin bakınız: Guiotto ve diğerleri, Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:177-180, 2002), yere spesifik PEGilasyon ve/veya mono-PEGilasyon (örneğin bakınız: Chapman ve diğerleri, Nature Biotech. 17:780-783, 1999) ve yer yönelimli enzimatik PEGilasyon (örneğin bakınız: Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 54:487-504, 2002) yer alır. Bu alanda açıklanan usuller ve teknikler tek bir protein molekülüne bağlı 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veya 10'dan fazla PEG veya PEG türevine sahip proteinler üretebilir (örneğin bakınız: U.S. 2006/0104968).

Bu alanda PEGilasyon için çok sayıda tepkime maddesi açıklanmıştır. Bu tepkime maddeleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla N-hidroksisüksinimidille (NHS) aktive edilmiş PEG, süksinimidil mPEG, $mPEG_2$-N-hidroksisüksinimid, mPEG süksinimidil alfa-metilbütanoat, mPEG süksinimidil propionat, mPEG süksinimidil bütanoat, mPEG karboksimetil 3-hidroksibütanoik asit süksinimidil ester, homobifonksiyonel PEG-süksinimidil propionat, homobifonksiyonel PEG propionaldehit, homobifonksiyonel PEG bütiraldehit, PEG maleimid, PEG hidrazit, p-nitrofenil-karbonat PEG, mPEG-benzotriazol karbonat, propionaldehit PEG, mPEG bütiraldehit, dallanmış $mPEG_2$ bütiraldehit, mPEG asetil, mPEG piperidon, mPEG metilketon, mPEG "bağlayıcısız" maleimid, mPEG vinil sülfon, mPEG tiol, mPEG ortopiridiltioester, mPEG ortopiridil disülfür, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsülfon PEG-NHS, akrilat PEG-NHS, floresin PEG-NHS ve biyotin PEG-NHS yer alır (örneğin bakınız: Monfardini ve diğerleri, Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Veronese ve diğerleri, J. Bioactive Compatible Polymers 12:197-207, 1997; U.S. 5,672,662; U.S. 5,932,462; U.S. 6,495,659; U.S. 6,737,505; U.S. 4,002,531; U.S. 4,179,337; U.S. 5,122,614; U.S. 5,324, 844; U.S. 5,446,090; U.S. 5,612,460; U.S. 5,643,575; U.S. 5,766,581; U.S. 5,795, 569; U.S. 5,808,096; U.S. 5,900,461; U.S. 5,919,455; U.S. 5,985,263; U.S. 5,990, 237; U.S. 6,113,906; U.S. 6,214,966; U.S. 6,258,351; U.S. 6,340,742; U.S. 6,413,507; U.S. 6,420,339; U.S. 6,437,025; U.S. 6,448,369; U.S. 6,461,802; U.S. 6,828,401; U.S. 6,858,736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; U.S.

2004/0235734; WO0500360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 1064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; ve WO 0187925).

ii. Sürekli veya Kontrollü Salım Formülasyonları ve Çözünür Hiyalüronidazları kodlayan Vektörler

ii. Sürekli Salım Formülasyonları

Hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bileşimleri sürekli veya kontrollü salım formülasyonları içinde temin edilebilir. Bunlar kontrol noktası inhibitörü ve/veya başka tümöre karşı maddeyle birlikte formüle edilebilir. Bazı örneklerde, sürekli veya kontrollü salım formülasyonları ayrıca başka bir terapötik madde(ler), örneğin kontrol noktası inhibitörü ve/veya ek bir tümöre karşı madde içerir. Çözünür hiyalüronidazlar gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulama için vektörler içinde temin edilebilir. Vektörler arasında hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi kodlayan ve eksprese eden onkolitik viral vektörler, örneğin adenovirüs onkolitik vektörleri ve vaksiniya virüsleri yer alır. Bunlar burada açıklananların herhangi biri de dâhil olmak üzere kontrol noktası inhibitörü gibi başka kansere karşı protein terapötik maddelerini de kodlayabilir.

Formülasyonlar lokal veya sistemik enjeksiyon için formüle edilebilir. Örnek sürekli salım formülasyonları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla tek katmanlı (unilamellar) veziküller (LUV) ve çok katmanlı veziküller (MVL) dâhil olmak üzere lipit veziküller, ilaç-reçine kompleksleri (rezinatlar) ve depo formülasyonları yer alır. Bu sürekli veya kontrollü salım formülasyonları bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir. Örneğin bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bir koloidal dispersiyon sistemi içinde veya polimerle stabilize edilmiş kristaller içinde kapsüllenebilir. Koloidal dispersiyon sistemleri arasında nanokapsüller, mikrosferler, boncuklar ve lipit bazlı sistemler, örneğin su içinde yağ emülsiyonları, miseller, karma miseller ve lipozomlar yer alır (örneğin bakınız: ABD Patenti No. 5,631.018). Çok katmanlı ve tek katmanlı lipozomlar yapmak için işlemlerin örnekleri bu alanda bilinmektedir (örneğin bakınız: ABD Patentleri No. 4,522,803, 4,310,506, 4,235,871, 4,224,179, 4,078,052, 4,394,372, 4,308,166, 4,485,054 ve 4,508,703). Yavaş salımlı tatbik taşıyıcılarının diğer örnekleri biyobozunur hidrojel matrisleri (ABD Patenti No. 5,041,292), dendritik polimer konjugatları (ABD Patenti No. 5,714,166) ve çok veziküllü lipozomlardır (DepoFoam®, DepoTech, San Diego, Kalif.) (ABD Patentleri No. 5,723,147 ve 5,766,627). Lokal enjeksiyon için bileşimleri

kapsüllemek için uygun mikrosferlerin bir tipi Fletcher, D. Anesth. Analg. 84:90-94 (1997)'de açıklandığı gibi poli(D,L-laktit) mikrosferlerdir.

Özellikle, sunulan sürekli salım formülasyonları, enzimin (veya başka maddenin/maddelerin) önceden belirlenmiş bir hızda salınacağı veya belirli bir süreyle sabit bir ilaç seviyesinin korunacağı şekilde şekilde dizayn edilebilir. Özellikle, formülasyonlar hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin (veya başka maddenin/maddelerin) tümör dokusu gibi lokal dokuya kontrollü bir salımına izin verir. Salım hızı, enzimin dokudaki (örneğin stroma) HA ayrışması üzerindeki etkisinin saatlerce, günlerce, haftalarca veya aylarca uzatılması için yeterince yavaştır. Bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin sürekli salım formülasyonları için optimum salım hızı ve süresi bu alanda uzman olanlar tarafından spesifik maddelerin farmakolojik özellikleri esas alınarak belirlenebilir.

Gerekirse, kan veya serum içine salınan hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin aktivitesi ölçülebilir. Bu alanda uzman olanların plazmadaki hiyalüronidazı ölçmek için bildiği herhangi bir tahlil uygulanabilir. Örneğin plazmadaki protein üzerinde bir mikrotürbidite tahlili veya enzimatik tahlil yapılabilir. Plazmanın normal olarak hiyalüronidaz enzimleri içerdiği takdir edilecektir. Bu plazma hiyalüronidaz enzimleri tipik olarak asidik bir pH'de aktiviteye sahiptir (ABD Patenti No. 7,105,330). Dolayısıyla burada açıklandığı gibi bir sürekli salım formülasyonuyla tedaviden önce, hiyalüronidazın plazma seviyelerinin belirlenmesi ve bir referans olarak kullanılması gerekir. Tedaviden sonraki plazma hiyalüronidaz seviyelerinin sonraki ölçümleri, tedavilerden önceki seviyelerle karşılaştırılabilir. Alternatif olarak, tahlil, normal olarak asidik pH'de aktivite gösteren plazmadaki endojen lizozomal hiyalüronidaz aktivitesini engelleyen pH koşulları altında yapılabilir. Dolayısıyla, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin nötr pH'de aktif olduğu durumda (örneğin beşeri PH20), sadece nötr aktif enzim seviyesi ölçülür.

Ayrıca, burada sunulan sürekli salım formülasyonları, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin nispeten stabil ve aktif olacağı şekilde dizayn edilebilir. Örneğin sürekli salım formülasyonları, formülasyonun toplam hiyalüronan ayrıştırıcı enzim aktivitesinin 25,000 U/mg ila 200,000 U/mg, örneğin 40,000 U/mg ila 150,000 U/mg, örneğin 75,000 U/mg ila 120,000 U/mg ve özellikle en az veya 40,000 U/mg, 50, 000 U/mg, 60,000 U/mg, 70,000 U/mg, 80,000 U/mg, 90,000 U/mg, 100,000 U/mg, 110,000 U/mg, 120,000 U/mg, 130,000 U/mg, 140,000 U/mg, 150,000 U/mg veya daha fazla olacağı şekilde temin edilir.

Sürekli salım formülasyonlarının sınırlandırıcı olmayan örnekleri ve örnek formülasyonlar aşağıdaki örneklerde sunulmaktadır. Ayrıca PCT başvurusu WO 2012/109387'ye bakınız.

a) Çok Veziküllü Lipozomlar (MVL)

Burada hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve özellikle bir hiyalüronidaz, örneğin PH20 veya çözünür veya rekombinant PH20 içeren çok veziküllü lipozom (MVL) formülasyonları gibi sentetik membran vezikülleri sunulmaktadır. Bazı örneklerde, ayrıca kontrol noktası inhibitörü ve/veya başka tümöre karşı veya kansere karşı madde gibi başka bir terapötik ilaç içeren MVL ortak formülasyonları sunulmaktadır. Çok veziküllü lipozom formülasyonları, tatbik edilecek bir ilacı veya maddeyi kapsülleyen çok sayıda eşmerkezli olmayan sulu bölmeden oluşan mikroskopik, küresel parçacıklar içerir. Münferit bölmeler sentetik kopyalar veya doğal olarak oluşan lipitlerden oluşan lipit çift tabakalı membranlarıyla ayrılır, böylece hem biyouyumlu hem biyobozunur bir tatbik aracı elde edilir. Buradaki örneklerde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler veya hidrofilik olan başka terapötik maddeler sulu faz içinde kapsüllenebilir. Buradaki başka örneklerde, bir hidrofilik ilaç ve bir hidrofobik ilacın aynı formülasyonda birlikte kapsüllenmesiyle bir MVL ortak formülasyonu temin edilir. Örneğin MVL ortak formülasyonlarında, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim sulu faz içinde kapsüllenir ve bir hidrofobik ilaç, örneğin finasterit veya dutasterit lipit fazı içine eklenir.

Bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi ve istenirse ayrıca başka bir maddeyi bir adjuvant, yayıcı madde veya terapötik bir madde olarak kullanılmak üzere bir hastaya tatbik etmeye yönelik usullerde membran vezikülleri kullanılabilir. Özellikle, membran vezikülleri bir terapötik madde olarak kullanıma yönelik farmasötik bileşimlerde temin edilir.

Çok veziküllü lipozomlar (MVL) bu alanda uzman olanların bildiği işlemlere göre hazırlanır (örneğin bakınız: ABD Patentleri No. 5, 723,147; 5,766,627; 6,106,858; 6,306,432; 5,962,016; 6,241,999; yayımlanmış ABD Patent Başvurusu No. US2007/0235889 ve US2010/030550; ve yayımlanmış Uluslararası Başvuru No. WO02/096368). Bu lipozomların oluşturulmasında, burada açıklanan veya bu alanda uzman olanların bildiği hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bileşimlerinin herhangi biri çok veziküllü lipozomların parçası olarak hazırlanabilir. Kısaca, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim içeren bir "yağ içinde su" emülsiyonu ilk olarak, amfipatik lipitler ve nötr lipitler lipit bileşeni için uçucu bir organik çözücü içinde eritilerek, lipit bileşenine enzimi ve/veya dâhil edilecek başka maddeyi içeren bir karışmaz ilk sulu bileşen ve MVL'lere yararlı

özellikler veren bir veya daha fazla yardımcı molekül, yani ozmotik eksipiyan ilave edilerek hazırlanır. Karışım, örneğin mekanik olarak karıştırma, çalkalama, sonikasyonla, ultrasonik enerji, meme atomizasyonu veya bunların kombinasyonlarıyle emülsifiye edilir. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ilk sulu bileşen içinde veya lipit bileşeni içinde veya her ikisi içinde bulunabilir. Daha sonra yağ içinde su emülsiyonunun tamamı ikinci sulu bileşenle karıştırılır, ardından yukarıdaki gibi mekanik olarak çalkalanarak ikinci sulu bileşen içinde süspansiyon halinde çözücü kürecikleri oluşturulur. Çözücü kürecikleri, içinde kapsüllenecek maddenin eridiği çok sayıda sulu damlacık içerir. Uçucu organik çözücü örneğin buharlaştırmayla küreciklerden çıkarılır. Çözücü tamamen buharlaştığında, çok veziküllü lipozomlar oluşur. MVL'ler salin veya depolama sıcaklıklarında parçacık stabilitesine izin veren uygun bir tampon gibi üçüncü bir sulu çözelti içinde yeniden süspansiyon haline getirilir, yıkanır ve saklanır. Çözücünün buharlaştırılmasında kullanım için uygun temsil edici gazlar arasında azot, helyum, argon, oksijen, hidrojen ve karbondioksit yer alır. Alternatif olarak, organik çözücü serpme, döner buharlaştırma veya çözücü seçici membranlarla çıkarılabilir.

Yayımlanmış PCT başvuru WO 2012/109387'de açıklandığı gibi, hidrofobik moleküller lipit çift tabakasına, hidrofilik ilacı (örneğin bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim) içeren bir ilk sulu bileşenle karıştırılmadan önce lipitler ve hidrofobik ilaç bir organik çözücü içinde eritilerek dâhil edilebilir. Dolayısıyla, usuller bir hidrofobik ve hidrofilik ilacın MVL ortak formülasyonlarını oluşturmak için de kullanılabilir.

Lipit fazı çözücüsü olarak uçucu hidrofobik çözücülerin birçok farklı tipi, örneğin eterler, halojene eterler, hidrokarbonlar, esterler, halojene hidrokarbonlar veya freonlar kullanılabilir. Çok veziküllü lipozomların oluşturulmasında örneğin dietil eter, izopropil ve başka eterler, kloroform, metilen klorür, tetrahidrofuran, etil asetat, Forane ve bunların kombinasyonları kullanılabilir.

Lipit bileşenlerinin bir nötr lipit ve bir amfipatik lipit içermesi koşuluyla, çok veziküllü lipozomlar yapmak için lipitlerin çeşitli tipleri kullanılabilir. Nötr lipitlerin örnekleri arasında diolefin, dipalmitolein gibi digliseritler; propilen glikol üzerinde kaprilik/kaprik asitlerin karma diesterleri gibi propilen glikol esterler; triolein, tripalmitolein, trilinolein, trikaprilin ve trilaurin gibi trigliseritler; soya fasulyesi yağı gibi bitkisel yağlar; domuz veya sığır yağı; skualen; tokoferol; ve bunların kombinasyonları yer alır. Özel örneklerde yavaş salım nötr lipitleri arasında örneğin triolein, tripalmitolein, trimiristolein, trilaurin, ve

trikaprin yer alır. Hızlı salım nötr lipitleri arasında örneğin trikaprilin ve trikaproin ve bunların karışımları yer alır. Amfipatik lipitlerin örnekleri arasında pH 7.4'te net negatif yüke, sıfır net yüke ve net pozitif yüke sahip olanlar yer alır. Bunlar arasında zvitteriyonik, asidik veya katyonik lipitler yer alır. Bu örnek amfipatik lipitler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla fosfatidilgliserol (PG), kardiolipin (CL), fosfatidilserin (PS), fosfatidik asit (PA), fosfatidilinozitol, fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), sfingomiyelin, diaçil trimetilamonyum propan (DITAP) ve bunların kombinasyonları yer alır. Ayrıca çok veziküllü lipozomları yapmak için kolesterol veya bitki sterolleri kullanılabilir. Seçilen lipit bileşeni, erime noktası MVL'nin depolandığı ve/veya kullanıldığı sıcaklığın altında olan bir lipit bileşeni de olabilir (örneğin bakınız: ABD Patenti No. 5,962,016).

Sentetik membran veziküllerinin örneklerinde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve özellikle pH20 veya rekombinant PH20 gibi bir hiyalüronidaz, enzimin stabilitesini koruyan veya arttıran ve/veya veziküllerin oluşum hızını arttıran bir veya daha fazla eksipiyanın varlığında hazırlanabilir. Özel örneklerde, eksipiyan hiyalüronik asittir (hiyalüronan olarak da adlandırılır; HA).

Elde edilen MVL'nin parçacık büyüklüğü değişebilir. Bir membran vezikülünün büyüklüğünü belirlemek ve bir vezikülü istenen bir uygulamaya göre seçmek bu alanda uzman olanların becerileri dâhilindedir. Örneğin bir lazer kırınımı parçacık büyüklüğü analizörü kullanılarak parçacık büyüklüğü analizi yapılabilir. Bazı örneklerde, burada sunulan membran veziküllerinin ortalama çapı (yaklaşık) 0.5 µm ila 100 µm, örneğin en az veya yaklaşık veya 0.5 µm, 1 µm, 5 µm, 10 µm, 15 µm, 20 µM, 50 µm veya 100 µm'dir.

Elde edilen MVL formülasyonları veya ortak formülasyonlar ayrıca enjekte edilebilen veya implante edilebilen yavaş salım depo formülasyonları elde etmek için süspansiyon ortamı veya başka biyolojik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ilavesiyle daha da seyreltilebilir veya süspansiyon haline getirilebilir. Yaygın uygun taşıyıcılar arasında sulu veya susuz çözeltiler, süspansiyonlar ve emülsiyonlar yer alır. Susuz çözeltilerin örnekleri propilen glikol, polietilen glikol, zeytinyağı gibi bitkisel yağlar ve etil oleat gibi enjekte edilebilir organik esterlerdir. Sulu taşıyıcılar arasında su, alkollü sulu çözeltiler, emülsiyonlar veya süspansiyonlar, örneğin salin ve tamponlu ortamlar yer alır. Parenteral taşıyıcılar arasında sodyum klorür çözeltileri, Ringer dekstrozu, dekstroz ve laktatlı Ringer çözeltisi yer alır. İntravenöz taşıyıcılar arasında sıvı ve besin ikmal ediciler, elektrolit ikmal ediciler (Ringer dekstrozuna dayananlar gibi) yer alır. Koruyucular ve başka katkı maddeleri, örneğin

antimikrobiyaller, antioksidanlar, şelatlama maddeleri ve etkisiz gazlar da bulunabilir (bakınız: Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16. Basım, A. Oslo, ed., Mack, Easton, Pa. 1980). Veziküllerin hazırlanmasına ilişkin diğer ayrıntılar örneğin yayımlanmış PCT başvurusu WO 2012/109387'de açıklanmakta ve dolayısıyla bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir.

b) MVL Ortak Formülasyonları

Burada başka bir terapötik madde veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle birlikte madde içeren veziküller sunulmaktadır. Diğer terapötik madde bu alanda uzman olanların bildiği herhangi bir ilaç veya madde olabilir ve özellikle bir kontrol noktası inhibitörü ve/veya başka kansere karşı maddeyi içerir. Diğer madde hidrofilik veya hidrofobik olabilir. Bazı örneklerde, MVL ortak formülasyonları, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve diğer maddeyi içeren bir ilk sulu bileşen organik çözücü içinde lipit bileşeniyle karıştırılarak hazırlanır. Başka örneklerde, diğer madde bir hidrofobik ilaçtır ve MVL ortak formülasyonları hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi içeren bir ilk sulu bileşen ve lipit bileşeni, hidrofobik ilacı da içeren bir organik çözücü içinde karıştırılarak hazırlanır. Burada hidrofobik ilacın organik çözücü içinde lipit bileşeniyle dâhil edilmesinin, hidrofobik ilacın MVL'nin lipit fazı içinde kapsüllenmesi veya eklenmesiyle sonuçlandığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle kombinasyon halinde oluşturulduğunda, MVL fomülasyonları aynı formülasyon içinde birlikte kapsüllenmiş bir hidrofilik ve bir hidrofobik ilaç içerir, bu durumda hiyalüronan ayrıştırıcı enzim sulu fazdadır ve hidrofobik ilaç lipit fazındadır. Örnek hidrofobik ilaçlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla dosetaksel, gemsitabin, glukokortikoitler yer alır. Bir hidrfobik ilaç içeren MVL ortak formülasyonlarının oluşturulmasına ilişkin olarak, burada, lipit ortak formülasyon parçacıklarının morfolojisinin ilaç konsantrasyonundan ve lipit konsantrasyonundan etkilenebildiği tespit edildi. Aktif kapsüllenmiş ilaçların aktivitesini korurken terapötik uygulamalar için yeterli morfolojiye sahip bir parçacık elde etmek için optimal ilaç ve lipit konsantrasyonlarının belirlenmesi bu alanda uzman olanların becerileri dâhilindedir. Örneklerde, morfolojiyi ve aktiviteleri ve değerlendirmek için prosedürlerin örnekleri verilmektedir.

D. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzimlerin ve Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörlerinin (örneğin Antikorlar) Nükleik Asitlerini ve Kodlanmış Polipeptitlerini Üretmenin Usulleri

Bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin bir PH20 gibi çözünür hiyalüronidaz) veya bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün (örneğin antikor) polipeptitleri de dâhil olmak üzere burada sunulan kullanım için kombinasyonlarda kullanıma yönelik polipeptitler, protein saflaştırması ve rekombinant protein ekspresyonu için bu alanda iyi bilinen usullerle elde edilebilir. Rekombinant DNA usulleri bu alanda uzman olanların alanı dâhilindedir. Burada açıklananların herhangi biri gibi ilgilenilen bir polipepidi kodlayan DNA sentetik olarak üretilebilir veya geleneksel prosedürler kullanılarak (örneğin genlere spesifik olarak bağlanabilen oligonükleotit probları kullanılarak) kolayca izole edilebilir ve dizilenebilir. Örneğin ilgilenilen bir polipeptidi ürettiği veya eksprese ettiği bilinen herhangi bir hücre veya doku kaynağı bu DNA'nın bir kaynağı olarak işlev görebilir. Polipeptitler nükleik asit moleküllerini klonlamak ve izole etmek için bu alanda bilinen usullerin herhangi biri kullanılarak klonlanabilir veya izole edilebilir. Bu usuller arasında nükleik asitlerin PCR amplifikasyonu ve toplulukların taranması, örneğin nükleik asit hibridizasyon taraması, antikor bazlı tarama ve aktivite bazlı tarama yer alır. Başka bir örnekte, DNA'nın dizisi biliniyorsa veya belirlenmişse, nükleik asit dizileri gen sentezi teknikleri kullanılarak oluşturulabilir.

İstenen bir polipeptidi kodlayan nükleik asit moleküllerini izole etmek üzere nükleik asitlerin amplifikasyonu için usuller, örneğin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) usulleri kullanılabilir. İstenen bir polipeptit kodlayıcı nükleik asit molekülünün izole edilebildiği bir başlangıç malzemesi olarak nükleik asit içeren bir malzeme kullanılabilir. Amplifikasyon usullerinde örneğin DNA ve mRNA terkipleri, hücre ekstraktları, doku ekstraktları, sıvı numuneleri (örneğin kan, serum, tükürük) veya sağlıklı ve/veya hasta deneklerden alınan başka numuneler kullanılabilir. Bir başlangıç malzemesi kaynağı olarak nükleik asit toplulukları da kullanılabilir. İstenen bir polipeptidi amplifiye etmek için primerler dizayn edilebilir. Örneğin, istenen bir polipeptidin üretildiği eksprese edilmiş diziler temelinde primerler dizayn edilebilir. Primerler bir polipeptit amino asit dizisinin geri tranlasyonu temelinde dizayn edilebilir. İstenen bir polipeptidi kodlamak için amplifikasyonla oluşturulan nükleik asit molekülleri dizilenebilir ve teyit edilebilir.

Ayrıca ilgilenilen bir proteinin modifiye edilmiş formlarını oluşturmak için mutagenez teknikleri kullanılabilir. DNA da modifiye edilebilir. Örneğin, proteinin özelliklerini, örneğin antikorun bağlanma özelliklerini veya stabilitesini veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin enzimatik aktivitesini değiştirmek için nükleotit eklemeleri, silinmeleri, ilaveleri veya ikameleri yapmak için gen sentezi veya rutin moleküler biyoloji teknikleri kullanılabilir.

Polipeptidi kodlayan bir nükleik asit molekülüne ek nükleotit dizileri de katılabilir. Bir örnekte, sentetik geni bir vektör, örneğin bir protein ekspresyon vektörü veya çekirdek protein kodlayıcı DNA dizilerinin amplifikasyonu için dizayn edilmiş bir vektör içine klonlanma amacı için bağlayıcı diziler, örneğin kısıtlama endonükleaz yerleri içeren diziler ilave edilebilir. Ayrıca, işlevsel DNA ögelerini belirleyen ek nükleotit dizileri, polipeptit kodlayıcı bir nükleik asit molekülüne işlevsel olarak bağlanabilir. Bu dizilerin örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla hücre içi protein ekspresyonunu kolaylaştırmak için dizayn edilmiş promotör dizileri ve protein salgılanmasını kolaylaştırmak için dizayn edilmiş salgılama dizileri, örneğin heterolog sinyal dizileri yer alır. Bu diziler bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir. Protein bağlanma bölgelerini belirleyen bazların dizileri gibi ek nükleotit kalıntıları da polipeptit kodlayıcı nükleik asit moleküllerine bağlanabilir. Bu bölgeler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, polipeptidin spesifik hedef hücreler içine alımını kolaylaştıran veya bunu kolaylaştıran proteinleri kodlayan veya sentetik genin ürününün farmakokinetiğini başka türlü değiştiren kalıntıların dizileri yer alır.

Ayrıca, örneğin polipeptidin saptanmasına veya afinite saflaştırmasına yardım etmek için etiketler veya başka kısımlar ilave edilebilir. Örneğin, bir epitop etiketini veya başka saptanabilir markörü belirten bazların dizileri gibi ek nükleotit kalıntısı dizileri de, enzim kodlayıcı nükleik asit moleküllerine bağlanabilir. Bu dizilerin örnekleri arasında bir His etiketini (örneğin6xHis, HHHHHH; DİZİ İD NO: 31) veya Flag Etiketini (DYKDDDDK; DİZİ İD NO: 20) kodlayan nükleik asit dizileri yer alır.

Saptanan ve izole edilen nükleik asitler daha sonra uygun bir klonlama vektörü içine eklenebilir. Bu alanda bilinen çok sayıda vektör-konakçı sistemi kullanılabilir. Muhtemel vektörler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla plazmitler veya modifiye virüsler yer alır, ama vektör sisteminin kullanılan konakçı hücreyle uyumlu olması gerekir. Vektör seçimi istenen uygulamaya bağlı olabilir. Bir klonlama vektörü içine ekleme örneğin, DNA

fragmanı tamamlayıcı kohezif terminalleri olan bir klonlama vektörü içine bağlanarak yapılabilir. Ekleme TOPO klonlama vektörleri (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanılarak yapılabilir. Klonlama vektöründe DNA'yı fragmanlarına ayırmak için kullanılan tamamlayıcı kısıtlama yerleri yoksa, DNA moleküllerinin uçları enzimatik olarak modifiye edilebilir. Alternatif olarak, nükleotit dizileri (bağlayıcılar) DNA terminalleri üzerine bağlanarak istenen herhangi bir yer üretilebilir; bu bağlanmış bağlayıcılar kısıtlama endonükleaz tanıma dizilerini kodlayan spesifik kimyasal olarak sentezlenmiş oligonükleotitleri içerebilir. Alternatif bir usulde, yarılmış vektör ve protein geni homopolimerik kuyruklamayla modifiye edilebilir.

Nükleik asidin eklenmesinden sonra, örneğin protein genlerini replikasyon ve/veya ekspresyon için amplifiye etmek için vektörler tipik olarak konakçı hücreler içine dâhil edilir. Rekombinant moleküller örneğin transformasyon, transfeksiyon, enfeksiyon, elektroporasyon ve sonoporasyon vasıtasıyla konakçı hücreler içine dâhil edilebilir, böylece gen dizisinin birçok kopyası oluşturulur. Spesifik düzenlemelerde, konakçı hücrelerin, izole edilmiş protein geni, cDNa, veya sentezlenmiş DNA dizisini içeren rekombinant DNA molekülleriyle transformasyonu, genin birden fazla kopyasının oluşturulmasını mümkün kılar. Dolayısıyla, transformantlar büyütülerek, transformantlardan rekombinant DNA molekülleri izole edilerek ve gerektiğinde eklenmiş gen izole edilmiş rekombinant DNA'dan geri alınarak gen büyük miktarlarda elde edilebilir. Bu tür örneklerde, yüksek seviyede ekspresyon için uygun bir vektör kullanılır. Örnek vektörler aşağıda açıklanmaktadır. Polipeptitler standart hücre kültürü ve bu alanda bilinen başka ekspresyon sistemleri kullanılarak eksprese edilebilir. Proteinler saflaştırılabilir.

1. Polipeptitleri Kodlayan Nükleik Asidin İzolasyonu veya Hazırlanması

a. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzim

Burada yukarıda C bölümünde açıklananların herhangi biri gibi, burada açıklanan hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin herhangi birini kodlayan nükleik asit molekülleri sunulmaktadır. Örneğin, burada DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen amino asit dizisine veya DİZİ İD NO: 123-158'in herhangi birinde verilen bir amino asit dizisine en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliği gösteren bir amino asit dizisine sahip çözünür PH20 polipeptitlerinin herhangi birini kodlayan nükleik asitler sunulmaktadır. Yukarıda

açıklandığı gibi, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi kodlayan DNA, sentetik olarak üretilebilir veya geleneksel prosedürler kullanılarak kolayca izole edilebilir. Bir hücre veya doku kaynağından, bir hiyalüronidazı kodlayan tam uzunlukta bir cDNA (yani bütün kodlama bölgesini kapsar) veya genomik DNA klonu elde etmek için bu alanda bilinen herhangi bir usul kullanılabilir. Modifiye edilmiş, örneğin budanmış veya varyant çözünür hiyalüronidazlar, yer yönelimli mutagenez de dâhil olmak üzere rekombinant DNA teknikleri kullanılarak bir yabani tip polipeptitten üretilebilir.

Nükleik asit molekülü ekspresyon için bir vektör içine eklenebilir. Bu vektörler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla lambda türevleri gibi bakteriyofajlar veya plazmitler, örneğin pCMV4, pBR322 veya pUC plazmit türevleri veya Bluescript vektör (Stratagene, La Jolla, CA) yer alır. Diğer ekspresyon vektörleri arasında burada örneklenen HZ24 ekspresyon vektörü yer alır. Diğer örnek vektörler aşağıda açıklanmaktadır.

b. Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörleri (örneğin Antikorlar)

Burada, yukarıda C Bölümünde açıklananların herhangi biri gibi, burada açıklanan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin herhangi birini kodlayan nükleik asit molekülleri sunulmaktadır. Örneğin burada, yukarıda C bölümünde açıklananların herhangi biri gibi bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru gibi, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikoru kodlayan nükleik asit molekülleri sunulmaktadır. Yukarıda açıklandığı gibi, burada sunulan nükleik asit molekülleri ve proteinler, bu alanda uzman olanların bildiği herhangi bir usulle yapılabilir. Bu prosedürler rutindir ve bu alanda uzman olanlar tarafından iyi bilinmektedir. Bunlar arasında rutin moleküler biyoloji teknikleri, örneğin gen sentezi, PCR, ligasyon, klonlama, transfeksiyon ve saflaştırma teknikleri yer alır.

Anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikorları gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorlar tam uzunlukta antikorlar olarak veya sınırlandırıcı olmamak koşuluyla bunların antijen bağlayıcı fragmanları, örneğin Fab, Fab', Fab menteşe, $F(ab')_2$, tek zincirli Fv (scFv), scFv tandem, Fv, dsFv, scFv menteşe, scFv menteşe(ΔE) diakoru, Fd ve Fd' fragmanları da dâhil olmak üzere tam uzunluktan az olan antikorlar olarak üretilebilir veya eksprese edilebilir. Genellikle, bir antikor fragmanı burada açıklananların herhangi biri gibi bir antikorun bir değişken ağır zincirini ve bir değişken hafif zincirini içerir.

Antikorların ve antikor fragmanlarının üretimi için çeşitli teknikler geliştirilmiştir (örneğin bakınız: Harlow ve Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor

Laboratory, New York). Örneğin antikor fragmanları tam antikorların proteolitik hidroliziyle hazırlanabilir (örneğin bakınız: Morimoto ve diğerleri (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117; Brennan ve diğerleri (1985) Science, 229:81). Örnneğin antikor moleküllerinin fragmanları, geleneksel usullerin kullanıldığı pepsin veya papainle yarma gibi enzimatik yarmayla üretilebilir. Örneğin papainle proteaz yarılması üzerine, ağır zincir sabit bölgelerinin bir dimeri, Fc sahası iki Fab bölgesinden (yani değişken bölgeleri içeren bölümler) ayrılır.

Fragmanlar, doğrudan rekombinant konakçı hücreler tarafından da üretilebilir. Örneğin Fab, Fv ve scFv antikor fragmanlarının hepsi *E. coli* gibi konakçı hücrelerde eksprese edilebilir ve bu hücrelerden salgılanabilir, böylece bu fragmanların büyük miktarlarda üretimi kolaylaşır. Ayrıca, Fab'-SH fragmanları kimyasal olarak bağlanarak $F(ab')_2$ fragmanları oluşturulabilir (Carter ve diğerleri (1992) Bio/Technology, 10:163-167). Başka bir yaklaşıma göre, $F(ab')_2$ fragmanları doğrudan rekombinant konakçı hücre kültüründen izole edilebilir. Bazı örneklerde, antikor tek zincirli bir Fv fragmanıdır (scFv) (örneğin bakınız: Uluslararası Patent Yayını No. WO93/16185; ve ABD Patentleri No. 5,571,894 ve 5,587,458). Fv ve scFv sabit bölgelerden yoksun tam birleşme yerlerini haiz tek türdür; dolayısıyla bunlar *in vivo* kullanım sırasında azalmış spesifik olmayan bağlanma için uygundur. scFv füzyon proteinleri oluşturularak, bir scFv'nin amino veya karboksi terminalinde bir efektör proteinin füzyonu sağlanabilir. Antikor fragmanı bir doğrusal antikor da olabilir (örneğin bakınız: ABD Patenti No. 5,641,870). Bu doğrusal antikor fragmanları monospesifik veya bispesifik olabilir. Antikor fragmanlarının üretimi için başka teknikler bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir.

Bazı örneklerde, sunulan kombinasyonlarda ve kullanıma yönelik kombinasyonlardaki antikor tek zincirli bir antikordur. Tek zincirli bir antikor bir antikorun antijen bağlama sahasından üretilebilir. Rekombinant teknikler kullanarak tek zincirli antikorlar üretmek için usuller bu alanda bilinmekte ve bunlar arasında örneğin Marasco ve diğerleri (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893; Whitlow ve Filpula (1991) Methods, 2: 97-105; Bird ve diğerleri (1988) Science 242:423-426; Pack ve diğerleri (1993) Bio/Technology 11:1271-77; ve ABD Patentleri No. 4,946,778, 5,840,300,5,667,988 ve 5,658,727'de açıklananlar yer almaktadır.

Tek zincirli antikorlar, spesifik bir antikorun bir ağır zincir değişken bölgesi (V_H) ve hafif zincir değişken bölgesi (V_L) birleştirilerek rekombinant olarak üretilebilir. Değişken

bölgeler için spesifik nükleik asit dizileri, örneğin polimeraz zincir reaksiyonu (PC) gibi standart moleküler biyoloji usulleriyle ve başka rekombinasyon nükleik asit teknolojileriyle klonlanabilir. scFv'leri üretmek için usuller örneğin Whitlow ve Filpula (1991) Methods; 2: 97-105; Bird ve diğerleri (1988) Science 242:423-426; Pack ve diğerleri (1993) Bio/Technology 11:1271-77; ve ABD Patentleri No. 4,946,778, 5,840,300, 5,667,988, 5,658,727 ve 5,258,498'de açıklanmaktadır.

Kombinasyonlara ve burada kullanıma yönelik kombinasyonlara dâhil edilen antikorlara beşeri özellikler verilebilir. Beşeri olmayan (örneğin murin) antikorların beşeri özellikler verilmiş formları, beşeri olmayan antikorlardan elde edilen bölümlerin asgari düzeyde olduğu genetik olarak üretilmiş kimerik antikorlar veya antikor fragmanlarıdır. Beşeri özellikler verilmiş antikorlar arasında, bir beşeri antikorun (alıcı antikor) tamamlayıcılık belirleme bölgelerinin istenen işlevselliğe sahip, fare, sıçan veya tavşan gibi insan dışı bir türün bir tamamlayıcılık belirleme bölgesinden (verici antikor) kalıntılarla değiştirildiği antikorlar yer alır. Bazı durumlarda, beşeri antikorun Fv çerçeve kalıntıları karşılık gelen beşeri olmayan kalıntılarla değiştirilir. Beşeri özellikler verilmiş antikorlar ne alıcı antikorda ne de alınan tamamlayıcılık belirleme bölgesi veya çerçeve dizilerinde bulunan kalıntılar da içerebilir. Genellikle, beşeri özellikler verilmiş antikorlar, tamamlayıcılık belirleme bölgelerinin tamamının veya esas itibarıyla tamamının beşeri olmayan bir antikorunkilere karşılık geldiği veya çerçeve bölgelerinin tamamının veya esas itibarıyla tamamının ilişkili bir beşeri konsensus dizisininkilere karşılık geldiği en az bir ve tipik olarak iki değişken sahanın hepsini içerir. Beşeri özellikler verilmiş antikorlar, tipik olarak bir beşeri antikordan elde edilen bir Fc bölgesi gibi bir antikor sabit bölgesinin en azından bir bölümünü de içerebilir (örneğin bakınız: Jones ve diğerleri, 1986, Nature 321:522-525; Riechmann ve diğerleri, 1988, Nature 332:323-329; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596).

Beşeri olmayan antikorlara beşeri özellikler vermek için usuller bu alanda iyi bilinmektedir. Genellikle, beşeri özellikler verilmiş antikor insan dışı bir kaynaktan gelen bir veya daha fazla amino asit kalıntısına sahiptir. Genellikle ithal kalıntılar olarak geçen bu beşeri olmayan amino asit kalıntıları tipik olarak ithal edilen bir değişken sahadan alınır. Beşeri özellikler, beşeri tamamlayıcılık belirleme bölgeleri örneğin karşılık gelen kemirgen tamamlayıcılık belirleme bölgeleriyle ikame edilerek verilebilir (örneğin bakınız: Jones ve diğerleri, 1986, Nature 321:522-525; Reichmann ve diğerleri, 1988. Nature 332:323-327; Verhoeyen ve diğerleri, 1988, Science 239:1534-15361; ABD Patenti No.

4,816,567). Dolayısıyla, bu beşeri özellikler verilmiş antikorlar, tam bir beşeri değişken sahanın esas itibarıyla daha azının insan dışı bir türden karşılık gelen diziyle ikame edildiği kimerik antikorlardır. Uygulamada, beşeri özellikler verilmiş antikorlar tipik olarak, bazı tamamlayıcılık belirleme bölgesi kalıntılarının ve muhtemelen bazı çerçeve kalıntılarının kemirgen antikorlardaki benzer yerlerden kalıntılarla ikame edildiği beşeri antikorlar olabilir.

Bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini gibi bir hedefe yönelik antikorları belirlemek için usuller de bilinmektedir. Örneğin antikorlar faj gösterim toplulukları da dâhil olmak üzere bilinen çeşitli teknikler kullanılarak belirlenebilir (örneğin bakınız: Hoogenboom ve Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks ve diğerleri, 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Cole ve diğerleri, 1985, Monoclonal antibodies and Cancer Therapy içinde, Alan R. Liss, sayfa 77; Boerner ve diğerleri, 1991. J. Immunol. 147:86-95). Antikorlar antikor moleküllerinin *in vivo* üretiminin uyarılmasının, immünoglobülin kitaplıklarının taranmasının (Orlandi. ve diğerleri, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter ve diğerleri, 1991, Nature 349:293-299) veya kültürde bu hücre hatlarıyla monoklonal antikor moleküllerinin üretilmesinin kullanıldığı çeşitli usullerin herhangi biriyle üretilebilir. Bunlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla hibridom tekniği, beşeri B hücresi hibridom tekniği ve Epstein-Barr virüsü (EBV) hibridom tekniği yer alır (Kohler ve diğerleri, 1975. Nature 256:4950497; Kozbor ve diğerleri, 1985. J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote ve diğerleri, 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole ve diğerleri, 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

Burada açıklananların herhangi biri gibi bir antikorun veya bunun fragmanının değişken ağır zincirinin ve değişken hafif zincirinin nükleik asit dizileri, burada açıklanan tam antikorların ve antikor fragmanlarının ekspresyonu için vektörler içine eklenebilir. Örneğin, İpilimumabın değişken ağır zincir ve değişken hafif zincir dizilerini (sırasıyla DİZİ İD NO: 22 ve 24) veya burada açıklanan herhangi bir antikorun değişken ağır zincir veya değişken hafif zincir dizilerini kodlayan nükleik asit burada açıklanan veya bu alanda uzman olanlar tarafından bilinen uygun bir ekspresyon vektörüne eklenebilir. Ağır zincirin veya hafif zincirin sabit bölgesinin tamamı veya bir bölümü de IgG antikorlarının veya bunların fragmanlarının ekspresyonu için vektöre eklenebilir veya vektörde bulunabilir. Ayrıca V_H-C_H1 ve V_L-C_L dizileri Fab moleküllerinin ekspresyonu için uygun bir ekspresyon vektörüne eklenebilir. Bir antikorun değişken ağır zincir ve değişken hafif zincir sahaları, tek zincirli antikorlar üretmek için değişken ağır zincir ve değişken hafif

zincir arasındaki bir bağlayıcıyı kodlayan bir vektör gibi uygun bir ekspresyon vektöründe eksprese edilebilir. Örnek bağlayıcılar arasında n'nin 1 (DİZİ İD NO: 37), 2 (DİZİ İD NO: 38), 3 (DİZİ İD NO: 39), 4 (DİZİ İD NO: 40), 5 (DİZİ İD NO: 41) veya daha yüksek pozitif bir tamsayı olduğu glisin açısından zengin esnek bağlayıcılar $(-G_4S-)_n$ yer alır.

2. Vektörler

Burada açıklanan herhangi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim polipeptidi veya bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor) gibi istenen proteinlerin birinin veya daha fazlasının rekombinant ekspresyonu için, proteini kodlayan nükleotit dizisinin tamamını veya bir bölümünü içeren nükleik asit uygun bir ekspresyon vektörü içine eklenebilir. Proteini kodlayan nükleotit dizisi de genellikle bir doğal veya heterolog sinyal dizisine bağlıdır. Vektörler enzim proteininin hücre içinde ekspresyonu için veya proteinin salgılanmış bir protein olarak eksprese edileceği şekilde seçilebilir. Proteini kodlayan nükleotitler dizisi de genellikle bir doğal veya heterolog sinyal dizisine bağlıdır. Vektörler enzim proteininin hücrede ekspresyonu için veya proteinin salgılanmış bir protein olarak eksprese edileceği şeklide seçilebilir.

Vektör seçimi istenen uygulamaya bağlı olabilir. Birçok ekspresyon vektörü bulunmakta ve bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir. Bir ekspresyon vektörü seçimi konakçı ekspresyon sistemi seçiminden etkilenir. Bu seçim bu alanda uzman olanların bilgileri dâhilindedir. Vektör eklenen protein kodlama dizisinin transkripsiyonu ve translasyonu için gerekli ögeleri içerir. Genel olarak, ekspresyon vekörleri transkripsiyon promotörleri ve isteğe bağlı olarak hızlandırıcılar, translasyon sinyalleri ve transkripsiyon ve translasyon sonlandırma sinyallerini içerebilir. Gerekli transkripsiyon ve translasyon sinyalleri enzim genleri için doğal promotör ve/veya sınırdaş bölgeler tarafından da sağlanabilir.

Stabil transformasyon için kullanılan ekspresyon vektörleri tipik olarak, transforme edilmiş hücrelerin seçimine ve korunmasına izin veren seçilebilir bir marköre sahiptir. Bazı durumlarda, hücrelerdeki vektörlerin kopya sayısını arttırmak için replikasyon orijini kullanılabilir. Vektörler genel olarak bağlanmış nükleik asit molekülüne işlevsel olarak bağlı ek nükleotit dizileri de içerebilir (örneğin His etiketi, Flag etiketi). Antikorlarla uygulamalar için, vektörler genellikle sabit bölgeyi kodlayan dizileri içerir. Dolayısıyla antikorlar veya bunların bölümleri protein füzyonları olarak da eksprese edilebilir. Bir

füzyon proteini, bir polipeptide ek işlevsellik ilave etmek için üretilebilir. Füzyon proteinlerinin örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla bir sinyal dizisinin, saptama veya görselleştirme için kullanılan bir epitop etiketinin (örneğin bir His_6 etiketi veya bir myc etiketi) veya saflaştırma için bir etiketin (örneğin bir GST füzyonu) ve protein salgılanmasını ve/veya membran birleşmesini yönetmek için bir dizinin füzyonları yer alır.

Protein kodlama dizisini eksprese etmek için çeşitli konakçı-vektör sistemleri kullanılabilir. Bunlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla virüsle (örneğin vaksiniya virüsü, adenovirüs ve başka virüsler) enfekte olmuş memeli hücre sistemleri; virüsle (örneğin bakülovirüs) enfekte edilmiş böcek hücre sistemleri; maya içeren maya vektörleri gibi mikroorganizmalar; veya bakteriyofaj, DNA, plazmit DNA veya kozmit DNA'yla transforme edilmiş bakteriler gibi bakteriler yer alır. Vektörlerin ekspresyon ögelerinin dayanıklılıkları ve spesifitileri değişir. Kullanılan konakçı-vektör sistemine bağlı olarak herhangi bir sayıda uygn transkripsiyon ve translasyon ögesi kullanılabilir.

DNA fragmanlarının bir vektör içine eklenmesi için bu alanda bilinen usullerin herhangi biri, uygun transkripsiyon/translasyon kontrol dizileri ve protein kodlama dizileri içeren bir kimerik gen ihtiva eden ekspresyon vektörleri oluşturmak için kullanılabilir. Bu usuller *in vitro* rekombinant DNA ve sentetik teknikleri ve *in vivo* rekombinantları (genetik rekombinasyon) içerebilir. Proteini kodlayan nükleik asit dizilerinin veya bunların sahaları, türevleri, fragmanları veya homologlarının ekspresyonu, genlerin veya fragmanlarının rekombinant DNA molekülüyle/molekülleriyle transforme edilmiş bir konakçıda eksprese edilebilmesi için ikinci bir nükleik asit dizisi tarafından regüle edilebilir.

Örneğin proteinlerin ekspresyonu bu alanda bilinen herhangi bir promotör/hızlandırıcı tarafından kontrol edilebilir. Uygun bakteriyel promotörler bu alanda iyi bilinmekte ve bunlar arasında aşağıda örneklenen promotörler gibi, memeli hücreleri, maya hücreleri ve böcek hücreleri için promotörler yer almaktadır. Bir heterolog nükleik asidin ekspresyonunu yönetmek için kullanılan promotörün seçimi spesifik uygulamaya bağlıdır. Spesifik bir düzenlemede, promotör istenen bir protein için genlere özgü değildir. Kullanılabilen promotörler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla ökaryotik ekspresyon vektörlerinde kullanım için olanlar, örneğin SV40 erken promotör (Bernoist ve Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), Rous sarkomu virüsünün 3' uzun terminal tekrarında bulunan promotör (Yamamoto ve diğerleri Cell 22:787-797 (1980)), herpes

timidin kinaz promotörü (Wagner ve diğerleri, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981)), metalotionein geninin regülatör dizileri (Brinster ve diğerleri, Nature 296:39-42 (1982)); prokaryotik ekspresyon vektörlerinde kullanım için olanlar, örneğin β-laktamaz promotörü (Jay ve diğerleri, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543) veya *tac* promotörü (DeBoer ve diğerleri, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983); ayrıca bakınız: "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": Scientific American içinde 242:74-94 (1980)); bitki ekspresyon vektörlerinde kullanım için olanlar, örneğin nopalin sentetaz promotörü (Herrera-Estrella ve diğerleri, Nature 303:209-213 (1984)) veya karnabahar mozaik virüsü 35S RNA promotörü (Gardner ve diğerleri, Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)) ve fotosentetik enzim ribuloz bisfosfat karboksilaz promotörü (Herrera-Estrella ve diğerleri, Nature 310:115-120 (1984)); maya ve başka mantarlardan promotör ögeleri, örneğin Gal4 promotörü, alkol dehidrojenaz promotörü, fosfogliserol kinaz promotörü, alkalin fosfataz promotörü ve doku spesifitesi gösteren ve transgenik hayvanlarda kullanılmış aşağıdaki hayvansal transkripsiyon kontrol bölgeleri yer alır: pankreas asinar hücrelerinde aktif olan elastaz I geni kontrol bölgesi (Swift ve diğerleri, Cell 38:639-646 (1984); Ornitz ve diğerleri, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987)); pankreas beta hücrelerinde aktif olan insülin geni kontrol bölgesi (Hanahan ve diğerleri, Nature 315:115-122 (1985)), lenfoid hücrelerde aktif olan immünoglobülin gen kontrol bölgesi (Grosschedl ve diğerleri, Cell 38:647-658 (1984); Adams ve diğerleri, Nature 318:533-538 (1985); Alexander ve diğerleri, Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), testis, meme, lenf ve mast hücrelerinde aktif olan fare meme tümörü virüsü kontrol bölgesi (Leder ve diğerleri, Cell 45:485-495 (1986)), karaciğerde aktif olan albümin geni kontrol bölgesi (Pinkert ve diğerleri, Genes ve Devel. 1:268-276 (1987)), karaciğerde aktif olan alfa-fetoprotein geni kontrol bölgesi (Krumlauf ve diğerleri, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer ve diğerleri, Science 235:53-58 1987)), karaciğerde aktif olan alfa-1 antitripsin geni kontrol bölgesi (Kelsey ve diğerleri, Genes and Devel. 1:161-171 (1987)), miyeloid hücrelerde aktif olan beta globin geni kontrol bölgesi (Magram ve diğerleri, Nature 315:338-340 (1985); Kollias ve diğerleri, Cell 46:89-94 (1986)), beynin oligodendrosit hücrelerinde aktif olan miyelin bazik protein geni kontrol bölgesi (Readhead ve diğerleri, Cell 48:703-712 (1987)), iskelet kasında aktif olan miyozin hafif zincir-2 geni kontrol bölgesi (Shani, Nature 314:283-286 (1985)) ve hipotalamusun gonadotroflarında aktif olan gonadotrofik serbest bırakıcı hormon geni kontrol bölgesi (Mason ve diğerleri, Science 234:1372-1378 (1986)) yer alır.

Promotöre ek olarak, ekspresyon vektörü tipik olarak, konakçı hücrelerde proteinin ekspresyonu için gerekli olan bütün ek ögeleri içeren bir transkripsiyon birimi veya ekspresyon kaseti içerir. Tipik bir ekspresyon kaseti proteini kodlayan nükleik asit dizisine işlevsel olarak bağlı bir promotör ve traskriptin verimli poliadenilasyoni için sinyaller, ribozom bağlama yerleri ve translasyon sonlandırıcı içerir. Kasetin ek ögeleri arasında hızlandırıcılar yer alabilir. Ayrıca, kaset tipik olarak etkili sonlandırma sağlamak için yapısal genin akış aşağısında bir transkripsiyon sonlandırma bölgesi içerir. Sonlandırma bölgesi promotör dizisiyle aynı genden elde edilebilir veya farklı genlerden elde edilebilir.

Bazı ekspresyon sistemleri timidin kinaz ve dihidrofolat redüktaz gibi gen amplifikasyonu sağlayan markörlere sahiptir. Alternatif olarak, gen amplifikasyonu içermeyen yüksek verimli ekspresyon sistemleri, örneğin polihedron promotörünün veya başka güçlü bakülovirüs promotörünün yönetimi altında bir proteini kodlayan bir nükleik asit dizisiyle birlikte, bir bakülovirüs vektörünün böcek hücrelerinde kullanımı da uygundur. Spesifik bir düzenlemede, istenen bir proteini veya bunun bir sahası, fragmanı, türevi veya homoloğunu kodlayan nükleik asitlere işlevsel olarak bağlı bir promotör, bir veya daha fazla replikasyon orijini ve isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla seçilebilir markör (örneğin bir antibiyotik direnç geni) içeren bir vektör kullanılır.

Birçok ekspresyon vektörü bulunmakta ve bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir ve proteinlerin ekspresyonu için kullanılabilir. Ekspresyon vektörü seçimi, konakçı ekspresyon sistemi seçiminden etkilenecektir. Genellikle, ekspresyon vektörleri transkripsiyon promotörleri ve isteğe bağlı olarak hızlandırıcılar, translasyon sinyalleri ve transkripsiyon ve translasyon sonlandırma sinyalleri içerebilir. Stabil transformasyon için kullanılan ekspresyon vektörleri, tipik olarak transforme olmuş hücrelerin seçimine ve korunmasına izin veren seçilebilir bir marköre sahiptir. Bazı durumlarda, vektörün kopya sayısını arttırmak için bir replikasyon kaynağı kullanılabilir.

Örnek ekspresyon vektörleri arasında örneğin pCMV gibi herhangi bir memeli ekspresyon vektörü yer alır. Bakteriyel ekspresyon için bu vektörler arasında pBR322, pUC, pSKF, pET23D ve füzyon vektörleri, örneğin MBP, GST ve LacZ yer alır. Diğer ökaryotik vektörler, örneğin ökaryotik virüslerden regülatör ögeler içerenlerin herhangi biri ökaryotik ekspresyon vektörleri olarak kullanılabilir. Bunlar arasında, örneğin SV40 vektörleri, papilloma virüsü vektörleri ve Epstein-Barr virüsünden elde edilen vektörler yer alır. Örnek ökaryotik vektörler arasında pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5,

bakülovirüs pDSCE, ve CMV promotörü, SV40 erken promotörü, SV40 geç promotörü, metalotionein promotörü, murin meme tümörü virüsü promotörü, Rous sarkomu virüsü promotörü, polihedron promotörü veya ökaryotlarda ekspresyon için etkili olduğu gösterilmiş diğer promotörlerin yönetimi altında proteinlerin ekspresyonuna izin veren herhangi bir başka vektör yer alır.

Bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim gibi, memeli hücresi ekspresyonu için örnek bir vektör HZ24 ekspresyon vektörüdür. HZ24 ekspresyon vektörü pCI vektörü omurgasından (Promega) elde edidi. Bu Beta-laktamaz direnç genini (AmpR) kodlayan DNA, bir F1 replikasyon orijini, bir Sitomegalovirüs dolaysız erken hızlandırıcı/promotör bölgesi (CMV) ve bir SV40 geç poliadenilasyon sinyali (SV40) içerir. Ekspresyon vektörü ayrıca ECMV virüsünden (Clontech) bir iç ribozom giriş yerine (IRES) ve fare dihidrofolat redüktaz (DHFR) genine sahiptir.

E. coli hücrelerinin transformasyonu için örnek plazmit vektörleri arasında örneğin pQE ekspresyon vektörleri (Qiagen, Valencia, CA'dan elde edilebilir; ayrıca Qiagen tarafından yayımlanan, sistemi açıklayan literatüre bakınız) yer alır. pQE vektörleri, bir faj T5 promotörü (*E. coli* RNA polimeraz tarafından tanınır) ve *E. coli*'de rekombinant proteinlerin sıkıca regüle edilmiş, yüksek seviyede ekspresyonunu sağlamak için bir ikili lac operatör represyon modülü, verimli translasyon için bir sentetik ribozomal bağlanma yeri (RBS II), bir 6XHis etiketi kodlama dizisi, t_0 ve T1 transkripsiyon sonlandırıcılar, ColE1 replikasyon orijini ve ampisilin direnci vermek için bir beta-laktamaz genine sahiptir. pQE vektörleri, rekombinant proteinin N veya C terminaline bir 6xHis etiketinin yerleştirilmesini mümkün kılar. Bu plazmitler arasında, üç okuma çerçevesinin hepsi için birden fazla klonlama yeri temin eden ve N terminal olarak 6xHis etiketli proteinlerin ekspresyonunu sağlayan pQE32, pQE 30 ve pQE 31 yer alır. *E. coli* hücrelerinin transformasyonu için diğer örnek plazmit vektörleri arasında örneğin pET ekspresyon vektörleri (örneğin bakınız: ABD Patenti 4,952,496; Novagen, Madison, WI'den elde edilebilir; ayrıca Novagen tarafından yayımlanan, sistemi açıklayan literatüre bakınız) yer alır. Bu plazmitler arasında T7lac promotörü, T7 sonlandırıcı, uyarılabilir *E. coli* lac operatörü ve lac represör genini içeren pET 11a; T7 promotörü, T7 sonlandırıcı ve *E. coli* ompT salgılama sinyali içeren pET 12a-c; ve bir His kolonuyla saflaştırmada kullanım için bir His-Tag™ lider dizisi ve kolon üzerinde saflaştırmanın ardından yarılmaya izin veren bir trombin yarılma yeri, T7-lac promotör bölgesi ve T7 sonlandırıcı içeren pET 15b ve pET 19b (Novagen, Madison, WI) yer alır.

DNA fragmanlarının bir vektöre eklenmesi için bu alanda uzman olanların bildiği usullerin herhangi biri, bir proteini veya bir antikor zincirini kodlayan bir nükleik asit içeren ekspresyon vektörleri oluşturmak için kullanılabilir. Bu usuller arasında *in vitro* rekombinant DNA ve sentetik teknikler ve *in vivo* rekombinantlar (genetik rekombinasyon) yer alabilir. Bir klonlama vektörüne ekleme örneğin, DNA fragmanı tamamlayıcı kohezif terminallere sahip bir klonlama vektörü içine bağlanarak yapılabilir. DNA'yı fragmanlarına ayırmak için kullanılan tamamlayıcı kısıtlama yerleri klonlama vektöründe yoksa, DNA moleküllerinin uçları enzimatik olarak modifiye edilebilir. Alternatif olarak, nükleotit dizileri (bağlayıcılar) DNA terminalleri üzerine bağlanarak herhangi bir istenen yer üretilebilir; bu bağlanmış bağlayıcılar kısıtlama endonükleaz tanıma dizilerini kodlayan spesifik kimyasal olarak sentezlenmiş nükleik asitler içerebilir.

Antikorların ekspresyonu için, genellikle bir antikorun ağır zincirini kodlayan nükleik asit bir vektör içine klonlanır ve bir antikorun hafif zincirini kodlayan nükleik asit bir vektör içine klonlanır. Genler ikili ekspresyon için tek bir vektör içine veya ayrı vektörler içine klonlanabilir. Bir örnekte, bir antikorun ağır zincirini kodlayan nükleik asit, bir ilk ekspresyon vektörü içine bağlanır ve bir antikorun hafif zincirini kodlayan nükleik asit ikinci bir ekspresyon vektörü içine bağlanır. Ekspresyon vektörleri aynı veya farklı olabilir, ancak bunlar genellikle proteinlerin (ağır ve hafif zincir) karşılaştırılabilir ekspresyonuna izin vermek için yeterince uyumludur. İstenirse, vektörler başka antikor formları oluşturmak için ek sabit bölgeyi/bölgeleri veya menteşe bölgelerini kodlayan başka diziler de içerebilir. Örnek vektörler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla pγ1HC ve pκLC yer alır (Tiller ve diğerleri (2008) J Immunol. Methods, 329:112-24). Diğer ekspresyon vektörleri arasında hafif zincir ekspresyon vektörü pAG4622 ve ağır zincir ekspresyon vektörü pAH4604 yer alır (Coloma ve diğerleri (1992) J Immunol. Methods, 152:89-104). pAG4622 vektörü beşeri κ L zincirinin C bölgesi sahasını kodlayan genomik diziyi ve gpt seçilebilir markörünü içerir. pAH4604 vektörleri hisD seçilebilir markörünü ve beşeri H zinciri γ1 C bölgesi sahasını kodlayan dizileri içerir. Başka bir örnekte, ağır ve hafif zincir hem ağır hem hafif zincir için ekspresyon kasetlerine sahip tek bir vektör içine klonlanabilir.

3. Hücreler ve Ekspresyon

Genel olarak, heterolog DNA eksprese etmek için tasarlanabilen ve bir salgılama yoluna sahip olan herhangi bir hücre tipi proteinlerin ekspresyonu için uygundur. *İn vivo* ve *in*

vitro usuller de dâhil olmak üzere bu usuller bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir. İstenen proteinler, uygulama ve tedavi için gerekli olan miktarlar ve/veya formlar gibi, proteinlerin gerekli miktarlarını ve formlarını üretmek için herhangi bir uygun organizmada eksprese edilebilir.

Ekspresyon konakçıları arasında bakteriyel hücreler (örneğin *E. coli*), maya, mantar hücreleri, Arkea, bitki hücreleri, böcek hücreleri, beşeri hücre hatları da dâhil olmak üzere memeli hücreleri ve transgenik hayvanlar gibi prokaryotik ve ökaryotik organizmalar yer alır. Ekspresyon konakçılarının protein üretim seviyelerinin yanı sıra, eksprese olan proteinler üzerinde bulunan translasyon sonrası modifikasyonların tipleri de farklı olabilir. Ayrıca, ekspresyon konakçısı seçimi çoğunlukla vektör seçimi ve kullanılan transkripsiyon ve translasyon ögeleriyle ilişkilidir. Örneğin ekspresyon konakçısı seçimi her zaman değilse de çoğunlukla kullanılan öncü dizi seçimine bağlıdır. Örneğin, birçok heterolog sinyal dizisi sadece aynı türün bir konakçı hücresinde eksprese edilebilir (yani bir böcek hücresi sinyal dizisi optimal olarak bir böcek hücresinde eksprese edilir). Buna karşılık, başka sinyal dizileri heterolog konakçılarda kullanılabilir, örneğin maya, böcek veya memeli konakçı hücrelerinde iyi işlerlik gösteren beşeri serum albümini (hHSA) sinyal dizisi ve böcek ve memeli hücrelerinde işlevsel olduğu gösterilmiş doku plasminojen aktivatörü pre/pro dizisi (Tan ve diğerleri, (2002) Protein Eng. 15:337). Ekspresyon konakçısı seçimi, bu ve başka faktörlere, örneğin mevzuat ve güvenlik faktörlerine, üretim maliyetlerine ve saflaştırma ihtiyacına ve usullerine dayanabilir. Dolayısıyla, vektör sisteminin kullanılan konakçı hücreyle uyumlu olması gerekir.

Vektörleri içeren prokaryotik ve ökaryotik hücreler sunulmaktadır. Bu hücreler arasında bakteriyel hücreler, maya hücreleri, fungal hücreler, Arkea, bitki hücreleri, böcek hücreleri ve hayvan hücreleri yer alır. Hücreler, yukarıda açıklanan hücreler kodlanmış proteinin hücre tarafından eksprese edildiği koşullar altında üretilerek ve eksprese olan protein geri kazanılarak bir proteinin üretimi için kullanılır. Örneğin protein ortam içine salgılanabilir.

Ökaryotik konakçılarda ekspresyon, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris* gibi mayalarda, *Drosophila* hücreleri ve *lepidopteran* hücreleri gibi böcek hücrelerinde, tütün, mısır, pirinç, alg ve Lemna gibi bitkiler ve bitki hücrelerinde ekspresyonu içerebilir. Ekspresyon için ökaryotik hücreler arasında Çin hamsteri yumurtalık (HCO) hücreleri veya bebek hamster böbrek (BHK) hücreleri gibi memeli hücre hatları da yer alabilir. Ökaryotik ekspresyon konakçıları arasında, serum, süt ve yumurtalarda üretim de dâhil olmak üzere

transgenik hayvanlarda üretim yer alır. Memeli ekspresyon sistemleri gibi ökaryotik ekspresyon genellikle, bir glikosile hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin PH20 gibi çözünür hiyalüronidaz) eksprese emek veya üretmek için olduğu gibi, bir proteinin glikosilasyonu istendiğinde kullanılır.

Prokaryotlar, özellikle *E. coli* büyük miktarlarda proteinler, örneğin yeniden toplanmış antikorlar veya bunların bölümleri için bir sistem sunar ve proteinlerin ekspresyonu ve saflaştırılmasına yönelik uygulamalarda özellikle istenir. *E. coli* transformasyonu bu alanda uzman olanların iyi bildiği basit ve hızlı bir tekniktir. Yüksek verimlilikle ekspresyon için *E. coli* konakçı suşları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla BL21 (EMD Biosciences) ve LMG194 (ATCC) yer alır. Örnek bir *E. coli* konakçı suşu BL21'dir. Yüksek verimli ekspresyon için vektörler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla pBR322 ve pUC vektörleri yer alır.

Rekombinant moleküller konakçı hücrelere örneğin transformasyon, transfeksiyon, enfeksiyon, elektroporasyon ve sonoporasyonla dâhil edilebilir, böylece gen dizisinin birçok kopyası üretilir. Örneğin vektörler konakçı hücrelerde transfekte ve eksprese edilebilir. Genellikle, daha sonra standart teknikler kullanılarak saflaştırılan, antikor zincirlerinin büyük miktarını eksprese eden bakteriyel, memeli, maya veya böcek hücre hatları üretmek için standart transfeksiyon usulleri kullanılır (örneğin bakınız: Colley ve diğerleri (1989) J. Biol. Chem., 264:17619-17622; Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology içinde, cilt 182 (Deutscher, ed.), 1990).

Ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin transformasyonu standart tekniklere göre yapılır (örneğin bakınız: Morrison (1977) J. Bact. 132:349-351; Clark-Curtiss ve Curtiss (1983) Methods in Enzymology, 101, 347-362). Örneğin, yabancı nükleotit dizilerini konakçı hücreler içine dâhil etmek için iyi bilinen prosedürlerin herhangi biri kullanılabilir. Bunlar arasında kalsiyum fosfat transfeksiyonu, polibren, protoplast füzyonu, elektroporasyon, biyolistik, lipozomlar, mikroenjeksiyon, plazma vektörleri, viral vektörler ve klonlanmış genomik DNA, cDNA, sentetik DNA veya başka yabancı genetik malzemeyi bir konakçı hücre içine dâhil etmek için iyi bilinen başka usullerin herhgin birinin kullanılması yer alır.

Genellikle, bir antikoru eksprese etmek için, konakçı hücreler en azından bir V_H zincirini kodlayan bir ilk vektör ve en azından bir V_L zincirini kodlayan ikinci bir vektörle transfekte edilir. Dolayısıyla, en azından her iki geni, antikor polipeptidini veya bunun modifiye edilmiş formunu eksprese edebilen konakçı hücre içine başarıyla dâhil etmek için

kullanılan spesifik genetik mühendisliği prosedürü yeterlidir. İlk ve ikinci ekspresyon vektörleri genellikle konakçı hücreler içine birlikte, tipik olarak 1:1 oranında transfekte edilir. Ekspresyon bu alanda uzman olanların bildiği herhangi bir hücre ekspresyon sisteminde olabilir. Örneğin, rekombinant konakçı hücrelerde antikorların sentezini sağlamak için, konakçı hücreler arasında aksi halde immünoglobilün proteini üretmeyen hücreler yer alır. Örneğin konakçı hücreler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla simian COS hücreleri, Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri, 293FS hücreleri, HEK293-6E hücreleri, NSO hücreleri veya başka miyelom hücreleri yer alır. Diğer ekspresyon vektörleri ve konakçı hücreler burada açıklanmaktadır.

Ekspresyon üzerine, antikor ağır ve hafif zincirler çifti disülfür bağıyla bağlanarak tam uzunlukta antikoru veya bunun fragmanlarını oluşturur. Örneğin tam uzunlukta bir Ig'nin ekspresyonu için, V_H-C_H1-menteşe-C_H2-C_H3'ü kodlayan diziler bir ilk ekspresyon vektörü içine klonlanabilir ve V_L-C_L sahalarını kodlayan diziler ikinci bir ekspresyon vektörü içine klonlanabilir. V_H-C_H1-menteşe-C_H2-C_H3 sahalarını kodlayan ilk ekspresyon vektörünün ve V_L-C_L sahalarını kodlayan ikinci ekspresyon vektörünün birlikte ekspresyonu üzerine, tam uzunlukta bir antikor eksprese olur. Başka bir örnekte, bir Fab üretmek için, V_H-C_H1'i kodlayan diziler bir ilk ekspresyon vektörü içine klonlanabilir ve V_L-C_L sahalarını kodlayan diziler ikinci bir ekspresyon vektörü içine klonlanabilir. Bir hafif zincire ve bir Fab monomerine sahip ağır zincir çiftleri oluşturulur. Çeşitli IgG alt tiplerinde C_H1, menteşe, C_H2 ve/veya C_H3 dizileri bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir (örneğin bakınız: ABD Yayını No. 20080248028). Benzer bir şekilde, C_L, lambda veya kappa dizileri de bilinmektedir (örneğin bakınız: ABD Yayını No. 20080248028). Bu dizilerin örnekleri burada sunulmaktadır.

a. Prokaryotik Hücreler

Prokaryotlar, özellikle *E. coli*, büyük miktarlarda proteinler üretmek için bir sistem sunmaktadır. *E. coli* transformasyonu bu alanda uzman olanların iyi bildiği basit ve hızlı bir tekniktir. *E. coli* için ekspresyon vektörleri uyarılabilir promotörler içerebilir, bu promotörler yüksek seviyelerde protein ekspresyonunu uyarmak ve konakçı hücrelerde bir toksisite gösteren proteinleri eksprese etmek için yararlıdır. Uyarılabilir promotörlerin örnekleri arasında lac promotörü, trp promotörü, hibrit tac promotörü, T7 ve SP6 RNA promotörleri ve sıcaklıkla ayarlanan λPL promotörü yer alır.

Burada sunulanların herhangi biri gibi proteinler *E. coli*'nin sitoplazmik ortamında eksprese edilebilir. Sitoplazma, indirgeyici bir ortamdır ve bazı moleküller için bu, çözünmez inklüzyon cisimlerinin oluşumuyla sonuçlanabilir. Ditiotreitol ve β-merkaptoetanol gibi indirgeyici maddeler ve guanidin-HCl ve üre gibi denatüranlar proteinleri yeniden çözündürmek için kullanılabilir. Alternatif bir yaklaşım, proteinlerin, bakterilerin periplazmik boşluğunda ekspresyonudur, bu oksitleyici bir ortam ve şaperonine benzer ve disülfür izomerazlar verir ve çözünür proteinin üretimine yol açabilir. Tipik olarak, eksprese edilecek proteine, proteini periplazmaya yönelten bir lider dizi kaynaştırılır. Daha sonra lider periplazma içindeki sinyal peptidazlar tarafından uzaklaştırılır.

Periplazmik hedefleme lider dizilerinin örnekleri arasında pektat liyaz geninden pelB lider ve alkalin fosfataz geninden elde edilen lider yer alır. Bazı durumlarda, periplazmik ekspresyon, eksprese edilen proteinin kültür ortamı içine sızmasına izin verir. Proteinlerin salgılanması kültür üst fazından hızlı ve basit saflaştırmaya izin verir. Salgılanmayan proteinler periplazmadan ozmotik lizizle elde edilebilir.Sitoplazmik ekspresyona benzer bir şekilde, bazı durumlarda proteinler çözünmez hale gelebilir ve çözünmeyi ve yeniden katlanmayı kolaylaştırmak için denatüranlar ve indirgeyici maddeler kullanılabilir. Uyarım ve büyüme sıcaklığı da ekspresyon seviyelerini ve çözünürlüğü etkileyebilir, tipik olarak 25°C ile 37°C arasındaki sıcaklıklar kullanılır. Tipik olarak, bakteriler aglikosile proteinler üretir. Dolayısıyla, proteinler işlev için glikosilasyonu gerektiriyorsa, glikosilasyon konakçı hücrelerden saflaştırmadan sonra *in vitro* ilave edilebilir.

b.Maya Hücreleri

Saccharomyces cerevisae, Schizosaccharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Kluyveromyces lactis ve *Pichia pastoris* gibi mayalar, burada açıklananların herhangi biri gibi proteinlerin üretimi için kullanılabilen iyi bilinen maya ekspresyon konakçılarıdır. Maya epizomal replikasyon vektörleriyle veya homolog rekombinasyonla stabil kromozomal entegrasyonla transforme edilebilir. Tipik olarak gen ekspresyonu regülasyonu için uyarılabilir promotörler kullanılır. Bu promotörlerin örnekleri arasında GAL1, GAL7 ve GAL5 ve metalotionein promotörleri, örneğin CUP1, AOX1 veya başka *Pichia* veya başka maya promotörü yer alır. Ekspresyon vektörleri transforme olmuş DNA'nın seçimi ve korunması için sıklıkla LEU2, TRP1, HIS3 ve URA3 gibi seçilebilir bir markör içerir. Mayada eksprese olan proteinler çoğunlukla çözünür proteinlerdir. Bip

gibi şaperoninlerle ve protin disülfür izomerazla birlikte ekspresyon, ekspresyon seviyelerini ve çözünürlüğü arttırabilir. Ayrıca, mayada eksprese edilen proteinler Saccharomyces cerevisae'den maya eşleşen tipte alfa-faktör salgılama sinyali gibi salgılama sinyali peptit füzyonları ve Ag2p eşleşen adhezyon reseptörü veya *Arxula adeninivorans* glukoamilaz gibi maya hücre yüzeyi proteinleriyle füzyonlar kullanılarak salgılama için yönlendirilebilir. Kaynaşık dizileri salgılama yolundan çıkarlarken eksprese olan polipeptitlerden uaklaştırmak için Kex-2 proteaz için olan gibi bir proteaz yarılma yeri üretilebilir. Maya Asn-X-Ser/Thr motiflerinde glikosilasyona da muktedirdir.

c. Böcek Hücreleri

Böcek hücreleri, özellikle bakülovirüs ekspresyonu kullanıldığında, proteinleri eksprese etmek için yararlıdır. Böcek hücreleri yüksek seviyelerde protein eksprese eder ve daha yüksek ökaryotlar tarafından kullanılan translasyon sonrası modifikasyonların çoğunu yapabilir. Bakülovirüs, güvenliği arttıran ve ökaryotik ekspresyonun mevzuata ilişkin problemlerini azaltan kısıtlayıcı bir konakçı aralığına sahiptir. Tipik ekspresyon vektörlerinde bakülovirüsün polihedrin ve p10 promotörü gibi yüksek seviyede ekspresyon için bir promotör kullanılır. Yaygın olarak kullanılan bakülovirüs sistemleri arasında *Autographa californica* nükleer polihedroz virüsü (AcNPV) ve *Bombyx mori* nükleer polihedroz virüsü (BmNPV) gibi bakülovirüsler ve *Spodoptera frugiperda, Pseudaletia unipuncta*(A7S) ve *Danaus plexippus*'tan (DpN1) elde edilen Sf9 gibi bir böcek hücre hattı yer alır. Yüksek seviyede ekspresyon için, eksprese edilecek molekülün nükleotit dizisi virüsün polihedrin başlatma kodonunun hemen akış aşağısına kaynaştırılır. Beşeri antikorlar eksprese edebilen bakülovirüs rekombinantları üretmek için, pAcUW51 (PharMingen) gibi bir ikili ekspresyon transferi kullanılabilir. Memeli salgılama sinyalleri böcek hücrelerinde doğru olarak işlenir ve eksprese edilen proteini kültür ortamı içine salgılamak için kullanılabilir. Ayrıca, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) ve *Danaus plexippus* (DpN1) hücre hatları memeli hücre sistemlerine benzer glikosilasyon örüntülerine sahip proteinler üretir.

Böcek hücrelerinde alternatif bir ekspresyon sistemi stabil bir şekide transforme olmuş hücrelerin kullanılmasıdır. Schneider 2 (S2) ve Kc hücreleri (*Drosophila melanogaster*) ve C7 hücreleri (*Aedes albopictus*) gibi hücre hatları ekspresyon için kullanılabilir. *Drosophila* metalotionein promotörü, kadmiyum veya bakırla ağır metal uyarımının varlığında yüksek seviyelerde ekspresyonu uyarmak için kullanılabilir. Ayrıca, *Spodoptera*

frugiperda'dan Sf9 türevli hücreler ve *Trichoplusia ni*'den TN türevli hücreler gibi hücre hatları da ekspresyon için kullanılabilir. Bakülovirüs dolaysız erken gen promotörü IE1 tutarlı ekspresyon seviyeleri elde etmek için kullanılabilir. Tipik ekspresyon vektörleri arasında pIE1-3 ve pI31-4 transfer vektörleri (Novagen) yer alır. Ekspresyon vektörleri tipik olarak neomisin ve higromisin gibi seçilebilir markörler kullanılarak korunur.

d. Memeli Hücreleri

Proteinleri eksprese etmek için memeli ekspresyon sistemleri kullanılabilir. Ekspresyon oluşumları adenovirüs gibi viral enfeksiyonla veya lipozomlar, kalsiyum fosfat, DEAE-destran gibi direkt DNA aktarımıyla ve elektroporasyon ve mikroenjeksiyon gibi fiziksel yollarla memeli hücrelerine aktarılabilir. Memeli hücreleri için ekspresyon vektörleri arasında tipik olarak bir mRNa başlık yeri, bir TATA kutusu, bir translasyon başlatma dizisi (Kozak konsensus dizisi) ve poliadenilasyon ögeleri yer alır. IRES ögeleri de seçilebilir bir markör gibi, başka bir genle bisistronik ekspresyona imkân vermek için ilave edilebilir. Bu vektörler arasında sıklıkla yüksek seviyede ekspresyon için transkripsiyon promotörü-hızlandırıcıları, örneğin SV40 promotörü-hızlandırıcısı, beşeri sitomegalovirüs (CMV) promotörü ve Rous sarkomu virüsünün (RSV) uzun terminal tekrarı yer alır. Bu promotörler-hızlandırıcılar birçok hücre tipinde aktiftir. Doku ve hücre tipi promotörleri ve hızlandırıcı bölgeleri de ekspresyon için kullanılabilir. Örnek promotör/hızlandırıcı bölgeleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla elastaz I, insülin, immünoglobülin, fare meme tümörü virüsü, albümin, alfa fetoprotein, alfa 1 antitripsin, beta globin, miyelin bazik proteini, miyozin hafif zincir 2 ve gonadotropik serbest bırakıcı hormon gen kontrolü gibi genlerden olanlar yer alır.

Ekspresyon oluşumunu içeren hücreleri seçmek ve korumak için seçilebilir markörler kullanılabilir. Seçilebilir markör genlerinin örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla higromisin B fosfotransferaz, adenozin deaminaz, ksantin-guanin fosforibosil transferaz, aminoglikozit fosfotransferaz, dihidrofolat redüktaz (DHFR) ve timidin kinaz yer alır. Örneğin ekspresyon, sadece DHFR genini eksprese eden hücreleri seçmek için metotreksatın varlığında yapılabilir. Antikorları eksprese etmek için bir NEO^R/G418 sistemi, bir dihidrofolat redüktaz (DHFR) sistemi veya bir glutamin sentetaz (GS) sistemi kullanılabilir. GS sisteminde, hem ağır zinciri hem hafif zinciri eksprese etmek için pEE12/pEE6 gibi birleşik ekspresyon vektörleri kullanılır. TCR-ζ ve $Fc_{\varepsilon}RI$-γ gibi hücre

yüzeyi sinyal moleküleriyle füzyon, hücre yüzeyi üzerinde aktif bir durumda proteinlerin ekspresyonunu yönetebilir.

Fare, sıçan, insan, maymun, tavuk ve hamster hücreleri de dâhil olmak üzere memeli ekspresyonu için birçok hücre hattı kullanılabilir. Örnek hücre hatları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, fare NS0 (salgılayıcı olmayan) ve başka miyelom hücre hatları, hibridom ve heterohibridom hücre hatları, lenfositler, fibroblastlar, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 ve HKB hücreleri yer alır. Hücre kültürü ortamından salgılanan proteinlerin saflaştırılmasını kolaylaştıran serumsuz ortamlara adapte edilmiş hücre hatları da vardır. Bunların örnekleri arasında CHO-S hücreleri (Invitrogen, Carlsbad, CA, kat. no. 11619-012) ve serumsuz EBNA-1 hücre hattı (Pham ve diğerleri, (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-342) yer alır. Maksimal ekspresyon için optimize edilmiş özel ortamlarda üretilmek üzere adapte edilmiş hücre hatları da vardır. Örneğin DG44 CHO hücreleri, kimyasal olarak tanımlı, hayvansal ürün içermeyen bir ortamda süspansiyon kültüründe üretim için adapte edilir.

e. Bitkiler

Burada açıklananların herhangi biri gibi proteinleri eksprese etmek için transgenik bitki hücreleri ve bitkiler kullanılabilir. Ekspresyon oluşumları tipik olarak bitkilere, doğrudan DNA aktarımı, örneğin mikroprojektil bombardımanı ve protoplastlar içine PEG dolayımlı aktarım kullanılarak ve agrobakteri dolayımlı transformasyonla aktarılır. Ekspresyon vektörleri promotör ve hızlandırıcı dizileri, transkripsiyon sonlandırma ögeleri ve translasyon kontrol ögeleri içerebilir.

Ekspresyon vektörleri ve transformasyon teknikleri genellikle *Arapbidopsis* ve tütün gibi çift çenekli konakçılar ve mısır ve pirinç gibi tek çenekli konakçılar olarak ayrılır. Ekspresyon için kullanılan bitki promotörlerinin örnekleri arasında karnabahar mozaik virüsü promotörü, nopalin sentetaz promotörü, riboz bisfosfat karboksilaz promotörü ve ubikitin ve UBQ3 promotörleri yer alır.

Higromisin, fosfomanoz izomeraz ve neomisin fosfotransferaz gibi seçilebilir markörler sıklıkla transforme olmuş hücrelerin seçimi ve korunması için kullanılır. Transforme olmuş bitki hücreleri, hücreler, agregalar (kallus dokusu) gibi kültürde korunabilir veya tam bitkiler halinde rejenere edilebilir. Transgenik bitki hücreleri arasında ayrıca proteinler üretmek için üretilen alglar da yer alır. Bitkiler memeli hücrelerinden farklı glikosilasyon örüntülerine sahip olduğu için, bu, bu konakçılarda üretilen proteinin seçimini etkileyebilir.

4. Saflaştırma Teknikleri

Konakçı hücrelerden proteinlerin saflaştırılması için usul, seçilen konakçı hücrelere ve ekspresyon sistemlerine bağlı olacaktır. Salgılanan moleküller için, proteinler genellikle hücreler uzaklaştırıldıktan sonra kültür ortamından saflaştırılır. Hücre içi ekspresyon için, hücreler lize edilebilir ve proteinler ekstrakttan saflaştırılabilir. Ekspresyon için transgenik bitkiler ve hayvanlar gibi transgenik organizmalar kullanıldığında, dokular veya organlar ize edilmiş bir ekstrakt elde etmek için başlangıç malzemesi olarak kullanılabilir. Ayrıca, transgenik hayvansal üretim, polipeptitlerin sütte veya yumurtalarda üretimini içerebilir, bunlar toplanabilir ve gerekliyse proteinler ekstrakte edilebilir ve bu alanda bilinen standart usuller kullanılarak daha da saflaştırılabilir.

Proteinler, tipik olarak promotör uyarımından sonra, büyük miktarlarda transforme edilmiş bakteriler tarafından eksprese edildiğinde, ekspresyon yapısal olmakla birlikte, polipeptitler çözünmez agregalar oluşturabilir. Bu alanda uzman olanların bildiği polipeptit inklüzyon cisimlerinin saflaştırılması için uygun olan çeşitli protokoller vardır. Çeşitli varyasyonlar bu alanda uzman olanlar için açık olacaktır.

Örneğin bir usulde, hücre süspansiyonu genellikle santrifüjden geçirilir ve inklüzyon cisimlerini içeren pelet, inklüzyon cisimlerini eritmeyen ama yıkayan tampon, örneğin 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl ve %2 Triton-X 100, noniyonik bir deterjan içinde yeniden süspansiyon haline getirilir. Mümkün olduğu kadar çok hücre dökünüsünü uzaklaştırmak için yıkama aşamasını tekrarlamak gerekli olabilir.Geri kalan inklüzyon cisimleri peleti, uygun bir tampon (örneğin 20 mM sodyum fosfat, pH 6.8, 160 mM NaCl) içinde yeniden süspansiyon haline getirilebilir. Diğer uygun tamponlar bu alanda uzman olanlar için açıktır.

Alternatif olarak, proteinler bakteri periplazmasından saflaştırılabilir. Protein bakterilerin periplazması içine gönderildiğinde, bakterilerin periplazmik fraksiyonu, bu alanda uzman olanların bildiği diğer usullerin yanı sıra soğuk ozmotik şokla izole edilebilir. Örneğin bir usulde, rekombinant polipeptitleri periplazmadan izole etmek için, bakteri hücreleri santrifüjden geçirilerek bir pelet oluşturulur. Pelet %20 sükroz içeren uygun bir tamponda yeniden süspansiyon haline getirilebilir. Hücreleri lize etmek için, bakteriler santrifüjden geçirilebilir ve pelet buz soğukluğunda 5 mM $MgSO_4$ içinde yeniden süspansiyon haline getirilebilir ve yaklaşık 10 dakika bir buz banyosunda tutulabilir. Hücre süspansiyonu santrifüjden geçirilir ve üst faz boşaltılır ve saklanır. Üst fazda bulunan rekombinant

proteinler konakçı proteinlerden, burada açıklanan ayırma teknikleri gibi, bu alanda uzman olanların iyi bildiği standart ayırma teknikleriyle ayrılabilir. Bu usuller sınırlandırıcı olmamak koşuluyla çözünürlükle fraksiyonlarına ayırma, boyut farkıyla filtrasyon ve kolon kromatografisi aşamalarını içerir.

Proteinler bu alanda bilinen standart protein saflaştırma teknikleri kullanılarak saflaştırılabilir. Bu usuller arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla SDS-PAGE, boyut fraksiyonu ve boyut dışlama kromatografisi, amonyüm sülfat çökeltme ve iyon değişimi kromatografisi, örneğin anyon değişimi kromatografisi yer alır. Verimliliği ve terkiplerin saflığını arttırmak için afinite saflaştırması teknikleri kullanılabilir. Afinite saflaştırmasında örneğin, hiyalüronidaz enzimlerini bağlayan antikorlar, reseptörler ve başka moleküller kullanılabilir. Bir myc epitop, GST -füzyon veya His_6 gibi bir afinite etiketini bir proteine eklemek için ve sırasıyla myc antikoru, glutaton reçinesi ve Ni reçinesiyle afinite saflaştırması için ekspresyon oluşumları da tasarlanabilir. Bu etiketler afinite saflaştırması usullerinde yardımcı olabilir.

Afinite saflaştırması teknikleri antikorları saflaştırmak için de kullanılabilir. Örneğin, burada sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorlar kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılabilir, burada bir katı destek kolon malzemesi, immünogloblinleri yüksek afiniteyle bağlayan, *Streptococcus*'tan hücre yüzeyiyle ilişkili bir protein olan Protein G'ye bağlıdır. Başka örneklerde, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorlar, bir katı destek kolon malzemesinin, IgG antikorları gibi, immünoglobülinleri yüksek afiniteyle bağlayan *Staphylococcus*'tan hücre yüzeyiyle ilişkili bir protein olan Protein A'ya bağlı olduğu kolon kromatografisiyle saflaştırılabilir (örneğin bakınız: Liu ve diğerleri (2010) MAbs 2(5):480-499). Burada sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorları saflaştırmak için kullanılabilen diğer immünoglobülin bağlayıcı bakteriyel proteinler arasında, Protein A ve Protein G'nin IgG bağlayıcı sahalarını birleştiren bir rekombinant füzyon proteini olan Protein A/G; ve *Peptostrepococcus*'ta bir yüzey proteini olan Protein L yer alır (Bjorck (1988) J. Immunol., 140(4):1194-1197; Kastern ve diğerleri (1992) J. Biol. Chem. 267(18):12820-12825; Eliasson ve diğerleri (1988) J. Biol. Chem. 263:4323-4327).

Saflık jel elektroforez ve boyama ve spektrofotometrik teknikler de dâhil olmak üzere bu alanda bilinen herhangi bir usulle değerlendirilebilir. Proteinler %60, %70, %80 saflığa kadar saflaştırılabilir ve tipik olarak en az %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97,

%98 veya %99 saflığa kadar saflaştırılabilir. Saflık SDS-PAGE ve coomassie boyaması gibi standart usullerle değerlendirilebilir. Uygun proteinler elde edildikten sonra, bunlar aktivite açısından test edilebilir. Örneğin bir antikor sınırlandırıcı olmamak koşuluyla ELISA, Western blotting veya yüzey plazmon rezonansı gibi bu alanda bilinen herhangi bir usulle bağlanma aktivitesi açısından test edilebilir. Bir çözünür hiyalüronidaz veya PH20 gibi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim hiyalüronidaz aktivitesi açısından test edilebilir. Saflaştırılmış bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin spesifik aktivitesi tipik olarak en az 70,000 ila 100,000 Birim/mg, örneğin yaklaşık 120,000 Birim/mg'dir. Spesifik aktivite modifikasyon, örneğin bir polimerle modifikasyon sonucunda değişebilir. Örneğin polimere konjuge edilmiş bir çözünür hiyalüronidaz (örneğin PEGPH20) gibi polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin spesifik aktivitesi 25,000 ila 60,000 Birim/mg, örneğin yaklaşık 35,000 Birim/mg'dir.

5. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzim Polipeptitlerinin PEGilasyonu

Polietilen glikol (PEG), esas olarak PEG tipik olarak immünojenik olmayan biyouyumlu, toksik olmayan, suda çözünür bir polimer olduğu için biyomalzemelerde, biyoteknolojide ve tıpta yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Zhao ve Harris, ACS Symposium Series 680: 458-72, 1997). İlaç tatbiki alanında, PEG türevleri, immünojenisiteyi, proteolizi ve böbrekten atılımı azaltmak ve çözünürlüğü arttırmak için proteinlere kovalent bağlamada (yani "PEGilasyon") yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16:157-82, 1995). Benzer bir şekilde, PEG çözünürlüğü arttırmak, toksisiteyi azaltmak ve biyodağılımı değiştirmek için düşük molekül ağırlıklı, nispeten hidrofobik ilaçlara bağlanmıştır. Tipik olarak PEGillenmiş ilaçlar çözeltiler olarak enjekte edilir.

Çok yakından ilişkili bir uygulama, ilaç tatbikinde kullanım için çapraz bağlı ayrışabilir PEG ağlarının veya formülasyonlarının sentezidir, çünkü ayrışabilir, çözünür ilaç taşıyıcıları dizaynında kullanılan kimyanın büyük kısmı ayrışabilir jellerin dizaynında da kullanılabilir (Sawhney ve diğerleri, Macromolecules 26: 581-87, 1993). Makromoleküller arası komplekslerin, iki tamamlayıcı polimerin çözeltileri karıştırılarak oluşturulabildiği de bilinmektedir. Bu kompleksler genellikle söz konusu polimerler arasındaki elektrostatik etkileşimlerle (polianyon-polikatyon) ve/veya hidrojen bağlarıyla (poliasit-polibaz) ve/veya sulu bir ortamda polimerler arasındaki hidrofobik etkileşimlerle stabilize edilir (Krupers ve diğerleri, Eur. Polym J. 32:785-790, 1996). Örneğin poliakrilik asit (PAAc) ve polietilen oksidin (PEO) çözeltilerinin uygun koşullar altında karıştırılması, çoğunlukla

hidrojen bağlanmasına dayanan komplekslerin oluşumuyla sonuçlanır. Bu komplekslerin fizyolojik koşullar altında ayrışması, serbest ilaçların (yani PEGillenmemiş ilaçların) tatbiki için kullnılmaktadır. Ayrıca, tamamlayıcı polimer kompleksleri hem homopolimerler hem kopolimerlerden oluşturulmaktadır.

Bu alanda PEGilasyon için çok sayıda tepkime maddesi açıklanmıştır. Bu tepkime maddeleri arasında sınırlandırıcı olmamak koyuluyla N-hidroksisüksinimidille (NHS) aktive edilmiş PEG, süksinimidil mPEG, $mPEG_2$-N-hidroksisüksinimid, mPEG süksinimidil alfa-metilbütanoat, mPEG süksinimidil propionat, mPEG süksinimidil bütanoat, mPEG karboksimetil 3-hidroksibütanoik asit süksinimidil ester, homobifonksiyonel PEG-süksinimidil propionat, homobifonksiyonel PEG propionaldehit, homobifonksiyonel PEG bütiraldehit, PEG maleimid, PEG hidrazit, p-nitrofenil-karbonat PEG, mPEG-benzotriazol karbonat, propionaldehit PEG, mPEG bütiraldehit, dallanmış mPEG2 bütiraldehit, mPEG asetil, mPEG piperidon, mPEG metilketon, mPEG "bağlayıcısız" maleimid, mPEG vinil sülfon, mPEG tiol, mPEG ortopiridiltioester, mPEG ortopiridil disülfür, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsülfon PEG-NHS, akrilat PEG-NHS, floresin PEG-NHS ve biyotin PEG-NHS yar alır (örneğin bakızın: Monfardini ve diğerleri, Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Veronese ve diğerleri, J. Bioactive Compatible Polymers 12:197-207, 1997; ABD Patentleri No. 5,672,662; U.S. 5,932,462; U.S. 6,495,659; U.S. 6,737,505; U.S. 4,002,531; U.S. 4,179,337; U.S. 5,122,614; U.S. 5,324, 844; U.S. 5,446,090; U.S. 5,612,460; U.S. 5,643,575; U.S. 5,766,581; U.S. 5,795, 569; U.S. 5,808,096; U.S. 5,900,461; U.S. 5,919,455; U.S. 5,985,263; U.S. 5,990, 237; U.S. 6,113,906; U.S. 6,214,966; U.S. 6,258,351; U.S. 6,340,742; U.S. 6,413,507; U.S. 6,420,339; U.S. 6,437,025; U.S. 6,448,369; U.S. 6,461,802; U.S. 6,828,401; U.S. 6,858,736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; WO0500360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; Avrupa Patentleri No. EP 1064951; EP 0822199; ve Uluslararası Patent Yayınları No. WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; ve WO 0187925).

Bir örnekte, polietilen glikolün molekül ağırlığı yaklaşık 3 kD ila yaklaşık 50 kD ve tipik olarak yaklaşık 5 kD ila yaklaşık 30 kD aralığındadır. PEG'in ilaca kovalent bağlanması ("PEGilasyon" olarak bilinir) bilinen kimyasal sentez teknikleriyle yapılabilir. Örneğin

proteinin PEGilasyonu, NHS ile aktive edilmiş PEG uygun reaksiyon koşulları altında proteinle reaksiyona sokularak yapılabilir.

PEGilasyon için çok sayıda reaksiyon açıklanmış olmakla birlikte, en genel olarak uygulanabilenler yönlülük verir, yumuşak reaksiyon koşulları kullanır ve toksik katalizörleri veya yan ürünleri uzaklaştırmak için yoğun akış aşağı işlemler gerektirmez. Örneğin, monometoksi PEG (mPEG) sadece bir reaktif terminal hidroksile sahiptir ve dolayısıyla kullanımı, oluşan PEG-protein ürün karışımının heterojenliğini sınırlandırır. Verimli protein PEGilasyonu sağlamak için genellikle polimerin, terminal metoksi grubunun karşısındaki ucundaki hidroksil grubunun aktivasyonu gerekli olup, amaç türevine dönüştürülmüş PEG'i nükleofilik saldırıya daha duyarlı hale getirmektir. Saldıran nükleofil genellikle bir lizil kalıntısının epsilon-amino grubudur, ama lokal koşullar uygunsa başka aminler de reaksiyona girebilir (örneğin histidinin N-terminal alfa-amini veya halka aminleri). Tek bir lizin veya sistein içeren proteinlerde daha yönlü bir bağlanma mümkündür. Son kalıntı tiole spesifik modifikasyon için PEG-maleimid tarafından hedeflenebilir. Alternatif olarak, PEG hidrazit periodatla oksitlenmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle reaksiyona sokulabilir ve $NaCNBH_3$'ün varlığında azaltılır. Daha spesifik olarak, PEGillenmiş CMP şekerleri uygun glikosil-transferazların varlığında bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle reaksiyona sokulabilir. Bir teknik, birkaç polimerik molekülün söz konusu polipeptide bağlandığı "PEGilasyon" tekniğidir. Bu teknik kullanılırken, bağışıklık sistemi, polipeptidin yüzeyi üzerindeki antikorların oluşumundan sorumlu epitopları tanımakta güçlüklerle karşılaşır, dolayısıyla bağışıklık yanıtı azalır. Belirli bir fizyolojik etki yapmak için doğrudan insan vücudunun dolaşım sistemine dâhil edilen polipeptitler (yani farmasötikler) için, tipik potansiyel bağışıklık yanıtı bir IgG ve/veya IgM yanıtıdır, solunum sistemi yoluyla içeri çekilen polipeptitler (yani sınai polipeptit) potansiyel olarak bir IgE yanıtına (yani alerjik yanıt) neden olabilir. Bağışıklık yanıtındaki azalmayı açıklayan teorilerin biri, polimerik molekülün/moleküllerin, polipeptidin yüzeyi üzerindeki, antikor oluşumuna yol açan bağışıklık yanıtından sorumlu olan epitopu/epitopları perdelemesidir. Başka bir teori veya en azından kısmi bir faktör, konjugat ne kadar ağırsa, bağışıklık yanıtının o kadar azalmasıdır.

Tipik olarak, PEGillenmiş hiyalüronidazlar da dâhil olmak üzere burada sunulan PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimleri yapmak için, PEG kısımları kovalent bağlanmayla polipeptitlere konjuge edilir. PEGilasyon için teknikler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla özel bağlayıcılar ve bağlama kimyaları (örneğin bakınız: Roberts ve

diğerleri, Adv. Drug Deliv. Rev. 54:459-476, 2002), birkaç PEG kısmının tek bir konjugasyon yerine bağlanması (dallanmış PEG'lerin kullanımıyla olduğu gibi; örneğin bakınız: Guiotto ve diğerleri, Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:177-180, 2002), yere spesifik PEGilasyon ve/veya mono-PEGilasyon (örneğin bakınız: Chapman ve diğerleri, Nature Biotech. 17:780-783, 1999) ve yer yönelimli enzimatik PEGilasyon (örneğin bakınız: Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 54:487-504, 2002) yer alır. Bu alanda açıklanan usuller ve teknikler tek bir protein molekülüne bağlı 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veya 10'dan fazla PEG veya PEG türevine sahip proteinler üretebilir (örneğin bakınız: ABD Patenti No. 2006/0104968).

PEGillenmiş hiyalüronidazlar gibi PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler yapmak için örnek bir usulün PEGilasyonunun örnek bir açıklaması olarak, PEG aldehitler, süksinimidler ve karbonatların her biri PEG kısımlarını, tipik olarak süksinimidil PEG'leri rHuPH20'ye konjuge etmek için uygulanır. Örneğin rHuPH20, mPEG-Süksinimidil Propionatlar (mPEG-SPA), mPEG-Süksinimidil Bütanoatlar (mPEG-SBA) ve ("dallanmış" PEG'leri bağlamak için) mPEG2-N-Hidroksilsüksinimid dâhil olmak üzere örnek süksinimidil monoPEG (mPEG) tepkime maddeleriyle konjuge edildi. Bu PEGillenmiş süksinimidil esterler PEG grubu ile aktive olmuş çapraz bağlayıcı arasında farklı uzunlukta karbon omurgaları ve tek veya dallanmış bir PEG grubu içerir. Bu farklar örneğin farklı reaksiyon kinetikleri elde etmek ve konjugasyon işlemi sırasında PEG'in rHuPH20'ye bağlanması için kullanılabilen yerleri potansiyel olarak kısıtlamak için kullanılabilir.

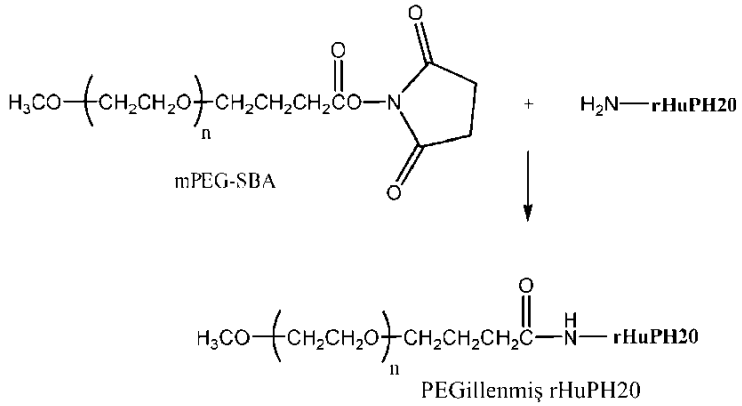
Doğrusal veya dallanmış PEG'ler içeren süksinimidil PEG'ler (yukarıdaki gibi) rHuPH20'ye konjuge edilebilir. PEG'ler, hiyalüronidaz başına ortalama olarak yaklaşık üç ila altı veya üç ila altı PEG molekülüne sahip moleküller içeren rHuPH20'leri tekrarlanabilir bir şekilde üretmek için kullanılabilir. Bu PEGillenmiş rHuPH20 bileşimleri kolayca saflaştırılarak, spesifik aktiviteleri yaklaşık 25,000 veya 30,000 Birim/mg protein hiyalüronidaz aktivitesi olan ve PEGillenmemiş rHuPH20'den esas itibarıyla ari olan (%5'ten az PEGillenmemiş) bileşimler elde edilebilir.

Çeşitli PEG tepkime maddeleri kullanılarak, örneğin mPEG-SBA (30 kD), mPEG-SMB (30 kD), ve mPEG2-NHS (40 kD) ve mPEG2-NHS'ye (60 kD) dayanan dallanmış versiyonlar kullanılarak hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin örnek versiyonları, özellikle çözünür beşeri rekombinant hiyalüronidazlar (örneğin rHuPH20) hazırlanabilir.

rHuPH20'nin PEGillenmiş versiyonları NHS kimyalarının yanı sıra karbonatlar ve aldehitler kullanılarak, aşağıdaki tepkime maddelerinin her biri kullanılarak üretildi: mPEG2-NHS-40K dallanmış, mPEG-NHS-10K dallanmış, mPEG-NHS-20K dallanmış, mPEG2-NHS-60K dallanmış; mPEG-SBA-5K, mPEG-SBA-20K, mPEG-SBA-30K; mPEG-SMB-20K, mPEG-SMB-30K; mPEG-bütiraldehit; mPEG-SPA-20K, mPEG-SPA-30K; ve PEG-NHS-5K-biyotin. PEGillenmiş hiyalüronidazlar, Dow Chemical Corporation'ın bir bölümü olan Dowpharma'dan elde edilebilen PEG tepkime maddeleri; örneğin Dowpharma'ya ait p-nitrofenil-karbonat PEG (30 kDa) ile ve propionaldehit PEG (30 kDa) ile PEGillenmiş hiyalüronidazlar kullanılarak da hazırlanmıştır.

Bir örnekte, PEGilasyon, mPEG-SBA'nın, örneğin mPEG-SBA-30K'nin (molekül ağırlığı yaklaşık 30 kDa) veya PEG bütanoik asit türevinin başka bir süksinimidil esterinin çözünür bir hiyalüronidaza konjugasyonunu içerir. mPEG-SBA-30K gibi PEG bütanoik asit türevlerinin süksinimidil esterleri proteinlerin amino gruplarına kolayca bağlanır. Örneğin, m-PEG-SBA-30K ve rHuPH20'nin (yaklaşık 60 KDa büyüklüğündedir) kovalent konjugasyonu, aşağıdaki Şema 1'de gösterildiği gibi rHuPH20 ve mPEG arasında stabil amid bağları temin eder.

Şema 1



Tipik olarak, mPEG-SBA-30K veya başka PEG hiyalüronan ayrıştırıcı enzime, bazı örneklerde bir hiyalüronidaza, uygun bir tampon içinde, örneğin pH 6.8'de 130 mM NaCl/10 mM HEPES veya70 mM fosfat tampon, pH 7 içinde 10:1 PEG:polipeptit molar oranında ilave edildikten sonra, sterilizasyon, örneğin steril filtrasyon uygulanır ve örneğin soğuk bir odada gece boyunca 4°C'de karıştırılarak konjugasyon sürdürülür. Bir örnekte, konjuge edilmiş PEG-hiyalüronan ayrıştırıcı enzim konsantre edilir ve tampon değişimi yapılır.

mPEG-SBA-30K gibi PEG bütanoik asit türevlerinin süksinimidil esterlerini bağlamanın başka usulleri bu alanda bilinmektedir (örneğin bakınız: ABD Patentleri No. 5,672,662; 6,737,505; ve ABD Patent Yayını No. 2004/0235734). Örneğin, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin bir hiyalüronidaz) gibi bi polipeptit, bir saat 4°C'de bir borat tampon (0.1 M, pH 8.0) içinde NHS ile aktive edilmiş bir PEG türevine bağlanabilir. Elde edilen PEGillenmiş protein ultrafiltrasyonla saflaştırılabilir. Alternatif olarak, bir büyükbaş hayvan alkalin fosfatazın PEGilasyonu, 4°C'de 30 dakika 0.2 M sodyum fosfat ve 0.5 M NaCl (pH 7.5) içeren bir tampon içinde fosfataz mPEG-SBA ile karıştırılarak sağlanabilir. Başka bir usulde, polipeptit pH'yi 7.2-9'a yükseltmek için trietilamin ilave edillmiş iyonu giderilmiş su içinde mPEG-SBA ile reaksiyona sokulur. PEGilasyonu tamamlamak için elde edilen karışım birkaç saat oda sıcaklığında karıştırılır.

Hayvansal türevli hiyalüronidazlar ve bakteriyel hiyalüronan ayrıştırı enzimler de dâhil olmak üzere hiyalüronan ayrıştırıcı polipeptitlerin PEGilasyonu için usuller bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir. Örneğin, büyükbaş hayvan testis hiyalüronidazının ve kondroitin ABC liyazın PEGilasyonunun açıklandığı Avrupa Patenti No. EP 0400472'ye bakınız. Ayrıca ABD Yayını No. 2006014968'de beşeri PH20'den elde edilen bir beşeri hiyalüronidazın PEGilasyonu açıklanmaktadır. Örneğin PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim genellikle molekül başına en az 3 PEG kısmı içerir. Örneğin hiyalüronan ayrıştırıcı enzimde PEG:protein molar oranı 5:1 ile 9.1 arasında, örneğin 7:1 olabilir.

E. Farmasötik Bileşimler ve Formülasyonlar

Burada, buradaki istemlere uygun olarak bir anti-hiyalüronan madde ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü maddesinin bileşimleri veya kombinasyonları sunulmaktadır. Örneğin burada polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitör maddesi, örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorun bileşimleri veya kombinasyonları sunulmaktadır. Bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı madde, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor formülasyonu, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim gibi bir anti-hiyalüronan madde içeren bileşimlerle birlikte formüle edilebilir veya birlikte uygulanabilir. Tipik olarak polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim gibi anti-hiyalüronan madde, ayrı ayrı uygulanan ayrı bileşimlerin bir kombinasyonu olarak, örneğin burada açıklandığı gibi

hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin önceden uygulanması için temin edilebilir. Bileşimler veya bileşimler kombinasyonu parenteral tatbik (örneğin sistemik tatbik) için formüle edilebilir. Örneğin bileşimler veya bileşimler kombinasyonu subkütanöz tatbik için veya intravenöz tatbik için formüle edilir.

Bileşimler ve kombinasyonlar tez dozaj uygulaması için veya çoklu dozaj uygulaması için formüle edilebilir. Maddeler doğrudan uygulama için formüle edilebilir. Bileşimler sıvı veya liyofilize bir formülasyon olarak temin edilebilir.

Bileşikler çözeltiler, süspansiyonlar, tabletler, dağılabilir tabletler, haplar, kapsüller, tozlar, sürekli salım formülasyonları veya eliksirler gibi uygun farmasötik terkipler halinde, ağızdan uygulama için, bunun yanı sıra transdermal plaster terkibi ve kuru toz inhalerleri (solukla içeri çekme aygıtı) olarak formüle edilebilir. Tipik olarak bileşikler bu alanda iyi bilinen teknikler ve prosedürler kullanılarak farmasötik bileşimler olarak formüle edilir (örneğin bakınız: Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Dördüncü Basım, 1985, 126). Genellikle formülasyon biçimi uygulama yoluna göre belirlenir. Bileşimler birlikte formüle edilebilir veya ayrı bileşimler olarak sunulabilir.

Genellikle bileşimler liyofilize veya sıvı formda formüle edilir. Bileşimler liyofilize formda sunulduğu durumda, kullanımdan hemen önce uygun bir tampon, örneğin bir steril salin çözeltisi kullanılarak sulandırılabilir. Bileşimler birlikte veya ayrı ayrı sunulabilir. Buradaki amaçlar için bu bileşimler tipik olarak ayrı ayrı sunulur. Anti-hiyalüronan madde, örneğin hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin bir PH20 gibi bir çözünür hiyalüronidaz) ve bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir madde birlikte, ardışık veya aralıklı olarak uygulamaya yönelik ayrı bileşimler olarak ambalajlanabilir. Kombinasyonlar bir kit olarak ambalajlanabilir.

Bileşimler intramüsküler, intravenöz, intradermal, intralezyonal, intraperitonal enjeksiyon, subkütanöz, intratümöral, epidural, nazal, ağızdan, vajinal, rektal, topikal, lokal, kulaktan, inhalasyonla, bukkal (örneğin sublingual) ve transdermal veya herhangi bir yol da dâhil olmak üzere bu alanda uzman olanların bildiği herhangi bir yolla uygulama için formüle edilebilir. Başka uygulama biçimleri de düşünülmektedir. Tedavi lokusuna bağlı olarak uygulama lokal, topikal veya sistemik olabilir. Tedavi gerektiren bir alana lokal uygulama örneğin sınırlandırıcı olmamak koşuluyla ameliyat sırasında lokal infüzyon, topikal uygulama, örneğin ameliyattan sonra bir yara pansuman malzemesiyle birlikte, enjeksiyonla, bir kateter vasıtasıyla, bir süpozituvar aracılığıyla veya bir implant

aracılığıyla yapılabilir. Bileşimler başka biyolojik olarak aktif maddelerle birlikte, art arda, aralıklı olarak veya aynı bileşim içinde de uygulanabilir. Uygulama kontrollü salım formülasyonları ve araçla kontrollü salımla, örneğin bir pompa aracılığıyla uygulanan kontrollü salım sistemlerini de içerebilir.

Herhangi bir belirli vakada en uygun yol tedavi edilmekte olan kanserin yapısı, ilerlemesi ve şiddeti ve kullanılan spesifik bileşim gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Buradaki amaçlar için, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin bir PH20 gibi bir çözünür hiyalüronidaz) gibi bir anti-hiyalüronan madde ve bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir madde (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor) plazmada farmasötik olarak kullanılabilir bir miktar veya seviyenin var olabileceği şekilde uygulanır. Örneğin, bileşimler sistemik olarak, örneğin intravenöz uygulamayla uygulanır. Subkütanöz usuller de kullanılabilir, ancak intravenöz usullerle karşılaştırıldığında eşdeğer biyoyararlanım sağlamak için emilim sürelerinin arttırılması gerekebilir. Bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı madde, farklı uygulama yollarıyla uygulanabilir. Farmasötik bileşimler her uygulama yolu için uygun dozaj formları halinde formüle edilebilir.

Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin, örneğin çözünür hiyalüronidazların ve başka moleküllerin proteolitik ayrıştırma ve antijenik ve immünojenik yanıtlar vasıtasıyla immünolojik müdahale gibi ayrıştırıcı süreçlere maruziyetini azaltmak için uygulama usulleri kullanılabilir. Bu usullerin örnekleri arasında anti-hiyalüronik maddenin tedavi yerine lokal uygulaması veya sürekli infüzyonu yer alır.

1. Formuülasyonlar

Farmasötik olarak kabul edilebilir bileşimler, hayvanlarda ve insanlarda kullanım için genel olarak kabul edilmiş farmakopeye göre hazılanan bir düzenleyici kuruluşun veya başka kurumun onayları dikkate alınarak hazırlanır. Bileşimler çözeltiler, süspansiyonlar, emülsiyon, tabletler, haplar, kapsüller, tozlar ve sürekli salım formülasyonları formunu alabilir. Bir bileşim geleneksel bağlayıcılar ve trigliseritler gibi taşıyıcılarla bir süpozituvar olarak formüle edilebilir. Ağızdan kullanıma yönelik formülasyon manitol, laktoz, nişasta, magnezyum stearat, sodyum sakarin, selüloz, magnezyum karbonat ve bu tür başka maddelerin farmasötik sınıfları gibi standart taşıyıcılar içerebilir. Formülasyonun uygulama biçimine uygun olması gerekir.

Farmasötik bileşimler, bir enzimin veya aktivatörün birlikte uygulandığı bir seyreltici, yardımcı madde veya eksipiyan gibi taşıyıcılar içerebilir. Uygun farmasötik taşıyıcıların örnekleri E. W. Martin tarafından "Remington's Pharmaceutical Sciences"ta açıklanmaktadır. Bu bileşimler, hastaya uygun uygulama için formu elde etmek üzere uygun bir miktarda taşıyıcıyla birlikte, genellikle saflaştırılmış formda bileşiğin terapötik olarak etkili bir miktarını içerecektir. Bu farmasötik taşıyıcılar, su ve petrol, hayvan, bitki veya sentetik kökenli olan yağlar, örneğin yerfıstığı yağı, soya fasulyesi yağı, mineral yağ ve susam yağı gibi steril sıvılar olabilir. Farmasötik bileşim intravenöz yolla uygulandığında tipik bir taşıyıcı sudur. Salin çözeltileri ve sulu dekstroz ve gliserol çözeltileri de özellikle enjekte edilebilir çözeltiler için sıvı taşıyıcılar olarak kullanılabilir. Bileşimler bir etken bileşenle birlikte laktoz, sükroz, dikalsiyum fosfat veya karboksimetilselüloz gibi bir seyreltici; magnezyum stearat, kalsiyum stearat ve talk gibi bir kayganlaştırıcı; ve nişasta, akasya zamkı gibi doğal zamklar, jelatin, glukoz, melaslar, polivinilpirolidin, selülozlar ve bunların türevleri, povidon, krospovidonlar ve bu alanda uzman olanların bildiği bu tür başka bağlayıcılar gibi bir bağlayıcı içerebilir. Uygun farmasötik eksipiyanlar arasında nişasta, glukoz, laktoz, sükroz, jelatin, malt, pirinç, un, tebeşir, silis jel, sodyum stearat, gliserol monostearat, talk, sodyum klorür, yağsız süt tozu, gliserol, propilen, glikol, su ve etanol yer alır. Bir bileşim istenirse az miktarda ıslatıcı veya emülsifiye edici maddeler veya pH tamponlama maddeleri, örneğin asetat, sodyum sitrat, siklodekstrin türevleri, sorbitan monolaurat, trietanolamin sodyum asetat, trietanolamin oleat ve bu tür başka maddeler de içerebilir.

Bir örnekte, farmasötik terkip sıvı formunda, örneğin çözeltiler, şuruplar veya süspansiyonlar olabilir. Bu sıvı terkipler geleneksel yollarla süspansiyon maddeleri (örneğin sorbitol şurubu, selüloz türevleri veya hidrojene yenebilir yağlar); emülsifiye edici maddeler (örneğin lesitin veya akasya); susuz taşıyıcılar (örneğin badem yağı, yağlı esterler veya fraksiyonlarına ayrılmış bitkisel yağlar); ve koruyucular (örneğin metil veya propil-p-hidroksibenzoatlar veya sorbik asit) gibi farmasötik olarak kabul edilebilir katkı maddeleriyle hazırlanabilir. Başka bir örnekte, farmasötik terkipler kullanımdan önce suyla veya başka uygun taşıyıcıyla sulandırılacak liyofilize formda sunulabilir.

Farmasötik ve terapötik olarak aktif bileşikler ve bunların türevleri tipik olarak birim dozaj formlarında veya çoklu dozaj formlarında formüle edilir ve uygulanır. Her birim doz gerekli farmasötik taşıyıcı veya seyreltici ile birlikte, istenen terapötik etkiyi yapmak için yeterli bir önceden belirlenmiş miktarda terapötik olarak aktif bileşiği içerir. Birim dozaj

formları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla bileşiklerin veya farmasötik olarak kabul edilebilir türevlerinin uygun miktarlarını içeren tabletler, kapsüller, haplar, tozlar, granüller, steril parenteral çözeltiler veya süspansiyonlar ve ağızdan kullanıma yönelik çözeltiler veya süspansiyonlar ve yağ su emülsiyonları yer alır. Birim doz formları ampuller veya şırıngalar veya tek tek ambalajlanmış tabletler veya kapsüller içinde bulunabilir. Birim doz formları bölünerek veya birden fazlası kullanılarak uygulanabilir. Bir çoklu doz formu, bölünmüş birim doz formu halinde uygulanacak tek bir kap içinde ambalajlanmış birbirinin aynı birçok birim dozaj formudur. Çoklu doz formlarının örnekleri arasında flakonlar, tablet veya kapsül şişeleri veya yarım litrelik veya galonluk şişeler yer alır. Dolayısıyla çoklu doz formu, ambalaj içinde bölünmemiş olan birçok birim dozdur. Genellikle geri kalanı toksik olmayan taşıyıcıdan oluşmak üzere %0.05 ila %100 aralığında etken bileşen içeren dozaj formları veya bileşimler hazırlanabilir.

Farmasötik bileşim her uygulama yolu için uygun dozaj formları halinde formüle edilebilir.

a. Enjekte edilebilir terkipler, çözeltiler ve emülsiyonlar

Genellikle, subkütanöz, intramüsküler, intratümöral, intravenöz veya intradermal enjeksiyonla karakterize edilen parenteral uygulama burada düşünülmektedir. Enjekte edilebilir terkipler geleneksel formlarda, sıvı çözeltiler veya süspansiyonlar, enjeksiyondan önce sıvı içinde çözelti veya süspansiyon haline getirilmek için uygun katı formlar veya emülsiyonlar olarak hazırlanabilir. Uygun eksipiyanlar örneğin su, salin, dekstroz, gliserol veya etanoldür. Ayrıca istenirse uygulanacak farmasötik bileşimler pH tamponlama maddeleri, metal iyonu tuzları veya bu tür başka tamponlar gibi bir çözücü formunda bir aktivatör de içerebilir. Farmasötik bileşimler ıslatıcı veya emülsifiye edici maddeler, pH tamponlama maddeleri, stabilizatörler, çözünürlük arttırıcılar gibi toksik olmayan yardımcı maddeleri ve sodyum asetat, sorbitan monolaurat, trietanolamin oleat ve siklodekstrinler gibi bu tür başka maddeleri de eser miktarlarda içerebilir. Sabit bir dozaj seviyesinin korunacağı şekilde bir yavaş salım veya sürekli salım sisteminin implante edilmesi de (örneğin bakınız: ABD Patenti No. 3,710,795) burada düşünülmektedir. Bu parenteral bileşimlerde bulunan etken bileşik yüzdesi, büyük ölçüde bileşiğin spesifik yapısının yanı sıra aktivitesine ve hastanın ihtiyaçlarına bağlıdır.

Enjekte edilebilir terkipler lokal ve sistemik uygulama için dizayn edilir. Buradaki amaçlar için, birikmiş veya aşırı hiyalüronanla ilişkili, tutulmuş interstisyuma doğrudan uygulama için lokal uygulama istenir. Parenteral uygulama için terkipler arasında enjeksiyon için

hazır steril çözeltiler, hipodermik tabletler de dâhil olmak üzere, kullanımdan hemen önce bir çözücüyle kombine edilmek için hazır liyofilize tozlar gibi steril kuru çözünür ürünler, enjeksiyon için hazır steril süspansiyonlar, kullanımdan hemen önce bir taşıyıcıyla kombine edilmek için hazır steril kurul çözünmez ürünler ve steril emülsiyonlar yer alır. Çözeltiler sulu veya susuz olabilir. İntravenöz yolla uygulanıyorsa, uygun taşıyıcılar arasında fizyolojik salin veya fosfat tamponlu salin (PBS) ve glukoz, polietilen glikol ve polipropilen glikol ve bunların karışımları gibi kıvam arttırıcı ve çözündürücü maddeler içeren çözeltiler yer alır.

Parenteral terkiplerde kullanılan farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar arasında sulu taşıyıcılar, susuz taşıyıcılar, antimikrobiyal maddeler, izotonik maddeler, tamponlar, antioksidanlar, lokal anestetikler, süspansiyon ve dispersiyon madddeleri, emülsifiye edici maddeler, ayırıcı veya şelatlayıcı maddeler ve başka farmasötik olarak kabul edilebilir maddeler yer alır. Sulu taşıyıcıların örnekleri arasında Sodyum klorür Enjeksiyon, Ringers Enjeksiyon, İzotonik Dekstroz Enjeksiyon, Steril Su Enjeksiyon, Dekstroz ve Laktatlı Ringers Enjeksiyon yer alır. Susuz parenteral taşıyıcılar arasında bitkisel kökenli sabit yağlar, pamuk çekirdeği yağı, mısır yağı, susam yağı ve yerfıstığı yağı yer alır. Fenoller veya krezoller, cıvalı maddeler, benzil alkol, klorobtanol, metil ve propil p-hidroksibenzoik asit esterler, timerosal, benzalkonyum klorür ve benzetonyum klorür de dâhil olmak üzere antimikrobiyal maddeler de bakteriyostatik veya fungistatik konsantrasyonlarda, çok dozlu kaplar halinde paketlenmiş paenteral terkiplere ilave edilebilir.

İzotonik maddeler arasında sodyum klorür ve dekstroz yer alır. Tamponlar arasında fosfat ve sitrat yer alır. Antioksidanlar arasında sodyum bisülfat yer alır. Lokal anestetikler arasında prokain hidroklorür yer alır. Süspansiyon ve dispersiyon maddeleri arasında sodyum karboksimetilselüloz, hidroksipropil metilselüloz ve polivinilpirolidon yer alır. Emülsifiye edici maddeler arasında Polysorbate 80 (TWEEN 80) yer alır. Metal iyonlarını ayırıcı ve şelatlayıcı bir madde EDTA'yı içerir. Farmasötik taşıyıcılar ayrıca suyla karışır taşıyıcılar için etil alkol, polietilen glikol ve propilen glikol ve pH ayarlaması için sodyum hidroksit, hidroklorik asit, sirttik asit veya laktik asidi içerir.

İntravenöz yolla uygulanırsa, uygun taşıyıcılar arasında fizyolojik salin veya fosfat tamponlu salin (PBS), ve glukoz, polietilen glikol ve polipropilen glikol ve bunların karışımları gibi kıvam arttırıcı ve çözündürücü maddeler içeren çözeltiler yer alır.

Farmasötik olarak aktif bileşiğin konsantrasyonu, bir enjeksiyonun istenen farmakolojik etkiyi yapmak için etkili bir miktarını temin edeceği şekilde ayarlanır. Tam doz bu alanda bilindiği gibi hastanın veya hayvanın yaşına, ağırlığına ve durumuna bağlıdır. Birim doz parenteral terkipleri bir ampul, flakon veya iğneli bir şırınga içinde ambalajlanır. Farmasötik olarak aktif bileşiği içeren sıvı çözeltinin veya sulandırılmış toz terkibin hacmi tedavi edilecek hastalığa ve ambalaj için seçilen spesifik imalat ürününe bağlıdır. Parenteral uygulama için bütün terkiplerin bu alanda bilindiği ve uygulandığı gibi steril olması gerekir.

b. Liyofilize tozlar

Burada sunulan bileşimler arasında çözeltiler, emülsiyonlar ve başka karışımlar olarak uygulama için sulandırılabilen liyofilize tozlar yer alır. Bunlar katılar veya jeller olarak da sulandırılabilir ve formüle edilebilir. Liyofilize tozlar yukarıda açıklanan çözeltilerin herhangi birinden hazırlanabilir.

Steril, liyofilize toz bir çözünür hiyalüronidaz gibi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim olan bir anti-hiyalüronan madde bileşiği ve/veya bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor (örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru) gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı madde bir tampon çözeltisi içinde eritilerek hazırlanır. Tampon çözeltisi, tozun veya tozdan hazırlanan sulandırılmış çözeltinin stabilitesini veya başka farmakolojik bileşenini geliştiren bir eksipiyan içerebilir. Daha sonra çözeltinin steril filtrasyonu ve ardından bu alanda uzman olanların bildiği standart koşullar altında liyofilizasyon istenen formülasyonu verir. Kısaca, liyofilize toz, dekstroz, sorbitol, fruktoz, mısır şurubu, ksilitol, gliserin, glukoz, sükroz veya başka uygun madde gibi bir eksipiyan sitrat, sodyum veya potasyum fosfat veya bu alanda uzman olanların bildiği bu tür başka tampon gibi uygun bir tampon içinde eritilerek hazırlanır. Daha sonra elde edilen karışıma seçilmiş bir enzim ilave edilir ve eriyene kadar karıştırılır. Elde edilen karışım steril filtreden geçirilir ve katı parçacıkları gidermek ve steriliteyi sağlamak için işlemden geçirilir ve liyofilizasyon için flakonlara bölüştürülür. Her flakon bileşiğin tek bir dozajını (1 mg-1 g, genellikle 1-100 mg, örneğin 1-5 mg) veya çoklu dozajlarını içerecektir. Liyofilize toz uygun koşullar altında, örneğin yaklaşık 4°C ila oda sıcaklığında saklanabilir.

Bu liyofilize tozun bir tampon çözeltisiyle sulandırılması parenteral uygulama için uygun bir formülasyon verir. Tam miktar tedavi edilen hastalığa ve seçilen bileşiği bağlıdır. Bu miktar ampirik olarak belirlenebilir.

c. Başka uygulama yolları için bileşimler

Tedavi edilen hastalığa bağlı olarak, burada topikal uygulama, transdermal plasterler, ağızdan ve rektal uygulama gibi başka uygulama yolları da düşünülmektedir. Örneğin topikal karışımlar, lokal ve sistemik uygulama için açıklandığı gibi hazırlanabilir. Elde edilen karışım bir çözelti, süspansiyon, emülsiyon veya benzeri olabilir ve kremler, jeller, merhemler, emülsiyonlar, çözeltiler, eliksirler, losyonlar, süspansiyonlar, tentürler, macunlar, köpükler, aerosoller, irigasyonlar, spreyler, süpozituvarlar, bandajlar, dermal plasterler veya topikal uygulama için uygun başka formülasyonların herhangi biri olarak formüle edilir.

Bileşikler lokal veya topikal uygulama için, örneğin cilde ve mukozalara, örneğin gözdeki mukozalara topikal uygulama için, jeller, kremlar ve losyonlar formunda ve göze uygulama veya intrasisternal veya intraspinal uygulama için formüle edilebilir. Topikal uygulama transdermal tatbik için ve ayrıca gözlere veya mukozaya uygulama için veya inhalasyon terapileri için düşünülmektedir. Tek başına veya başka farmasötim olarak kabul edilebilir eksipiyanlarla kombinasyon halinde etken bileşiğin nazal çözeltileri de uygulanabilir.

Transdermal uygulama için uygun formülasyonlar sunulmaktadır. Bunlar uzun bir süre hastanın üst derisiyle yakın temas halinde kalmak üzere adapte edilen ayrı plasterler gibi herhangi bir uygun formda temin edilebilir. Bu plasterler etken bileşiğe göre örneğin 0.1 ila 0. M konsantrasyonda, isteğe bağlı olarak tamponlanmış sulu çözelti içinde etken bileşiği içerir. Transdermal uygulama için uygun formülasyonlar iyontoforezle de tatbik edilebilir (örneğin bakınız: Pharmaceutical Research 3(6), 318 (1986)) ve tipik olarak etken bileşiğin isteğe bağlı olarak tamponlanmış bir sulu çözeltisi formunu alır.

Rektal uygulama için farmasötik dozaj formları sistemik etki için rektal süpozituvarlar, kapsüller ve tabletlerdir. Reaktör süpozituvarlar, rektumdan uygulanan, vücut sıcaklığında eriyerek veya yumuşayarak bir veya daha fazla farmakolojik veya terapötik olarak etken bileşeni serbest bırakan katı cisimler içerir. Rektal süpozituvarlarda kullanılan farmasötik olarak kabul edilebilir maddeler bazlar veya taşıyıcılar ve erime noktasını yükseltmek için maddelerdir. Bazların örnekleri arasında kakao yağı (teobroma yağı), gliserin-jelatin,

carbowax (polioksietilen glikol) ve yağ asitlerinin mono-, di- ve trigliseritlerinin uygun karışımları yer alır. Çeşitli bazların kombinasyonları kullanılabilir. Süpozituvarların erime noktasını yükseltmek için maddeler arasında ispermeçet ve balmumu yer alır. Rektal süpozituvarlar sıkıştırma usulüyle veya kalıplanarak hazırlanabilir. Bir rektal süpozituvarın tipik ağırlığı yaklaşık 2 ila 3 g'dir. Rektal uygulama için uygun formülasyonlar birim doz süpozituvarları olarak temin edilebilir. Bunlar, etken bileşik bir veya daha fazla geleneksel katı taşıyıcıyla, örneğin kakao yağıyla karıştırıldıktan sonra elde edilen karışım şekillendirilerek hazırlanabilir. Rektal uygulama için tabletler ve kapsüller ağızdan uygulamaya yönelik formülasyonlarla aynı farmasötik olarak kabul edilebilir madde kullanılarak ve aynı usullerle imal edilir.

Ağızdan uygulama için, farmasötik bileşimler örneğin, bağlayıcı maddeler (örneğin önceden jelatinize edilmiş mısır nişastası, polivinil pirolidon veya hidroksipropil metilselüloz); dolgu maddeleri (örneğin laktoz, mikrokristalin selüloz veya kalsiyum hidrojen fosfat); kayganlaştırıcı maddeler (örneğin magnezyum stearat, talk veya silis); parçalayıcılar (örneğin patatest nişastası veya sodyum nişasta glikolat); veya ıslatıcı maddeler (örneğin sodyum lauril sülfat) gibi farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyanlarla geleneksel yollarla hazırlanan tabletler veya kapsüller formunu alabilir. Tabletler bu alanda iyi bilinen usullerle kaplanabilir.

Bukkal (sublingual) uygulama için uygun formülasyonlar arasında örneğin tat verilmiş bir baz, genellikle sükroz ve akasya veya kitre içinde etken bileşiği içeren pastiller; ve bileşiği jelatin ve gliserin veya sükroz ve akasya gibi etkisiz bir baz içinde içeren pastiller yer alır.

Farmasötik bileşimler kontrollü salım formülasyonları ve/veya tatbik araçlarıyla da uygulanabilir (örneğin bakınız: ABD Patentleri No. 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,687,660; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,556; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533 ve 5,733,566).

Sınırlandırıcı olmamak koşuluyla lipozomlar içinde kapsülleme, mikroparçacıklar, mikrokapsüller, bileşiği eksprese edebilen rekombinant hücreler, reseptör dolayımlı endositoz ve bir çözünür hiyalüronidazı kodlayan nükleik asit moleküllerinin veya retrovirüs tatbik sistemleri gibi başka maddenin tatbiki gibi çeşitli tatbik sistemleri bilinmektedir ve seçilen bileşimleri uygulamak için kullanılabilir.

Dolayısıyla, bazı düzenlemelerde, buradaki bileşimlerin uygulanmasında lipozomlar ve/veya nanoparçacıklar da kullanılabilir. Lipozomlar sulu bir ortamda dağıtılan ve

kendiliğinde çok katmanlı eş merkezli çift tabakalı veziküller (çok katmanlı veziküller (MLV'ler) olarak da geçer) oluşturan fosfolipitlerden oluşturulur. MLV'lerin boyutları genellikle 25 nm ila 4 μm'dir. MLV'lerin sonikasyonu, çekirdek içinde sulu bir çözelti içeren, çapı 200 ila 500 angstrom aralığında olan küçük tek katmanlı veziküllerin (SUV'lar) oluşumuyla sonuçlanır.

Fosfolipitler suyun içinde dağıtıldıklarında, lipitin suya molar oranına bağlı olarak lipozomlar dışında çeşitli yapılar oluşturabilir. Düşük oranlarda lipozomlar oluşur. Lipozomların fiziksel özellikleri pH, iyon gücü ve iki değerlikli katyonların varlığına bağlıdır. Lipozomlar iyonik ve polar maddelere düşük geçirgenlik gösterebilir, ama yüksek sıcaklıklarda geçirgenliklerini belirgin bir şekilde değiştiren bir faz geçişine uğrarlar. Faz geçişi, jel hali olarak bilinen sıkıca paketlenmiş, düzenli bir yapıdan akışkan hal olarak bilinen gevşek paketlenmiş, daha az düzenli bir yapıya doğru bir değişimi içerir. Bu, karakteristik bir faz geçiş sıcaklığında olur ve iyonlar, şekerler ve ilaçlara geçirgenlikte bir artışla sonuçlanır.

Lipozomlar hücrelerle farklı mekanizmalar vasıtasıyla etkileşime girer: makrofajlar ve nötrofiller gibi retiküloendotelyal sistemin fagositik hücreleri tarafından endositoz; spesifik olmayan zayıf hidrofobik veya elektrostatik kuvvetlerle veya hücre yüzeyi bileşenlerinin spesifik etkileşimleriyle hücre yüzeyine adsorpsiyon; lipozomun lipit çift tabakasının plazma membranına eklenmesi, eş zamanlı olarak lipozomal içeriğin sitoplazma içine salınmasıyla füzyon; ve lipozom içeriğinde herhangi bir birleşme olmadan lipozomal lipitlerin hücre veya hücre altı membranlara aktarımı veya tersi. Aynı anda birden fazla mekanizma çalışabilmekle birlikte, lipozom formülasyonunun değiştirilmesi çalışan mekanizmayı değiştirebilir. Nanokapsüller bileşikleri stabil ve tekrar üretilebilir bir şekilde yakalayabilir. Hücre içi polimerik aşırı yüklenmeye bağlı yan etkilerden kaçınmak için, *in vivo* ayrışabilen polimerler kullanılarak ultra ince parçacıklar (0.1 μm civarında) dizayn edilmelidir. Bu koşulları karşılayan biyobozunur polialkil-siyanoakrilat nanoparçacıkları burada kullanım için düşünülmektedir ve bu parçacıklar kolayca yapılabilir.

2. Formülasyon Miktarları

Bileşimler tek dozaj uygulaması için veya çoklu dozaj uygulaması için formüle edilebilir. Bazı örneklerde, maddeler doğrudan uygulama için formüle edilir.

a. Hiyalüronan Ayrıştırıcı Enzim Formülasyonları

Anti-hiyalüronan maddenin bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim olduğu burada sunulan bileşimlerde veya bileşimlerin kombinasyonlarında, polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim doğrudan uygulama için 0.5 μg ila 50 mg, örneğin 100 μg ila 1 mg, 1 mg ila 20 mg, 100 μg ila 5 mg, 0.5 μg ila 1450 μg, 1 μg ila 1000 μg, 5 μg ila 1250 μg, 10 μg ila 750 μg, 50 μg ila 500 μg, 0.5 μg ila 500 μg veya 500 μg ila 1450 μg aralığında veya yaklaşık bu aralıktaki bir miktarda formüle edilir. Örneğin polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim doğrudan uygulama için doz başına 15 Birim (U) veya 150 Birim (U) ila 60,000 Birim, 300 U ila 30,000 U, 500 U ila 25,000 U, 500 U ila 10,000 U, 150 U ila 15,000 U, 150 U ila 5000 U, 500 U ila 1000 U, 5000 U ila 45,000 U 10,000 U ila 50,000 U veya 20,000 U ila 60,000 U aralığındaki veya yaklaşık bu aralıktaki bir miktarda, örneğin en az veya yaklaşık en az veya yaklaşık vela 15 U, 50 U, 100 U, 200 U, 300 U; 400 U; 500 U; 600 U; 700 U; 800 U; 900 U; 1,000 U; 1250 U; 1500 U; 2000 U; 3000 U; 4000 U; 5,000 U; 6,000 U; 7,000 U; 8,000 U; 9,000 U; 10,000 U; 20,000 U; 30,000 U; 40,000 U; veya 50,000 U miktarında formüle edilir.

Bileşimdeki polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim 10 U/mL ila 15,000 U/mL, 10 U/mL ila 5000 U/mL, 10 U/mL ila 2000 U/mL, 10 U/mL ila 1000 U/mL, 10 U/mL ila 600 U/mL, 10 U/mL ila 500 U/mL, 30 U/mL ila 3000 U/mL, 30 U/mL ila 1000 U/mL, 50 U/mL ila 4000 U/mL, 100 U/mL ila 2000 U/mL, 100 U/mL ila 1000 U/mL, 300 U/mL ila 2000 U/mL, 600 U/mL ila 2000 U/mL, 600 U/mL ila 1000 U/mL, 1000 U/mL ila 15,000 U/mL, 100 U/mL ila 5,000 U/mL, 500 U/mL ila 5,000 U/mL veya 100 U/mL ila 400 U/mL aralığındaki veya yaklaşık bu aralıktaki bir konsantrasyonda, örneğin en az veya en az yaklaşık veya yaklaşık veya 30 U/mL, 35 U/mL, 40 U/mL, 50 U/mL, 100 U/mL, 150 U/mL, 200 U/mL, 300 U/mL, 400 U/mL, 500 U/mL, 600 U/mL, 700 U/mL, 800 U/mL, 900 U/mL, 1000 U/mL, 2000 Units/mL, 3000 U/mL, 4000 U/mL, 5000 U/mL, 6000 U/mL, 7000 U/mL, 8000 U/mL, 9000 U/mL, 10,000 U/mL, 11,000 U/mL, 12,000 U/mL veya 12,800 U/mL konsantrasyonunda temin edilebilir.

Polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim 0.1 μg/mL ila 10 mg/mL, örneğin 1 μg/mL ila 5 mg/mL veya 1 mg/mL ila 5 mg/mL aralığındaki veya yaklaşık bu aralıktaki bir konsantrasyonda temin edilebilir. Bazı örneklerde, bileşimdeki polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim 0.1 μg/mL ila 100 μg/mL, 0.1 μg/mL ila 50 μg/mL, 0.1

μg/mL ila 20 μg/mL, 1 μg/mL ila 100 μg/mL, 1 μg/mL ila 50 μg/mL, 1 μg/mL ila 20 μg/mL, 20 μg/mL ila 100 μg/mL, 20 μg/mL ila 50 μg/mL veya 50 μg/mL ila 100 μg/mL aralığındaki veya yaklaşık olarak bu aralıktaki bir konsantrasyonda, örneğin en az veya en az yaklaşık veya yaklaşık 0.1 μg/mL, 1 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL, 20 μg/mL, 30 μg/mL, 40 μg/mL, 50 μg/mL, 60 μg/mL, 70 μg/mL, 80 μg/mL, 90 μg/mL veya 100 μg/mL konsantrasyonunda temin edilebilir.

Bileşimin hacmi 0.5 mL ila 1000 mL, örneğin 0.5 mL ila 100 mL, 0.5 mL ila 10 mL, 1 mL ila 500 mL, 1 mL ila 10 mL, örneğin en az veya yaklaşık en az veya yaklaşık veya 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL veya daha fazla olabilir. Bileşim genel olarak, polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim yaklaşık 50 mL'yi aşmayan hacimlerde uygulanacak şekilde formüle edilir ve tipik olarak 5-30 mL hacminde, genellikle yaklaşık 10 mL'yi aşmayan bir hacimde uygulanır. Daha büyük hacimler için, infüzyon süresi daha büyük hacmin tatbikini kolaylaştırmak için adapte edilebilir. Örneğin infüzyon süresi en az 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika, 20 dakika, 30 dakika, 40 dakika, 50 dakika, 1 saat veya daha fazla olabilir.

Örneğin, burada sunulduğu gibi polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin, örneğin polimere konjuge edilmiş bir çözünür hiyalüronidazın standart bir stabilize edilmiş formülasyonu EDTA, NaCl, $CaCl_2$, histidin, laktoz, albümin, Pluronic® F68, TWEEN® ve/veya başka deterjan veya başka benzer maddelerin biri veya daha fazlasıyla formüle edilir. Örneğin burada sunulan bileşimler bir veya daha fazla pH tamponu (örneğin histidin, fosfat veya başka tamponlar gibi) veya asidik tampon (asetat, sitrat, pirüvat, Gly-HCl, süksinat, laktat, maleat veya başka tamponlar gibi), tonisite değiştirici (örneğin bir amino asit, polialkol, NaCl, trehaloz, başka tuzlar ve/veya şekerler gibi), stabilizatör, etilendiamintetraasetat (EDTA) veya kalsiyum ETDA (CaEDTA) gibi şelatlama maddesi, metionin, askorbik asit/askorbat, sitrik asit/sitrat veya albümin gibi oksijen tutucu ve/veya bir aromatik halka içeren koruyucu (örneğin fenol veya krezol) gibi bir koruyucu içerebilir.

Bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim içeren bileşimler için yararlı olan örnek stabilizatörler arasında deterjanlar, örneğin polisorbatlar ve beşeri serum albümini gibi proteinler yer alır. Buradaki bileşimlerde yararlı olar serum albümininin örnek konsantrasyonları arasında 0.1 mg/mL ila 1 mg/mL, örneğin en az veya en az yaklaşık veya yaklaşık veya 0.1 mg/mL, 0.2

mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.9 mg/mL veya 1 mg/mL yer alır, ama daha çok veya daha az olabilir.

Bileşimlerde, %0.001 ila %0.1 aralığındaki konsantrasyonlarda veya yaklaşık bu konsantrasyonlarda, örneğin en az yaklaşık veya en az veya yaklaşık veya %0.001, %0.002, %0.003, %0.004, %0.005, %0.006, %0.007, %0.008, %0.009, %0.01, %0.02, %0.03, %0.04, %0.05, %0.06, %0.07, %0.08, %0.09 veya %0.1 konsantrasyonunda polisorbatlar da bulunabilir.

Kalsiyum EDTA (CaEDTA) gibi bir metal şelatlama maddesi de örneğin yaklaşık 0.02 mM ila 20 mM aralığındaki konsantrasyonlarda, örneğin en az yaklaşık veya en az veya yaklaşık veya 0.02 mM, 0.04 mM, 0.06 mM, 0.08 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM, 0.6 mM, 0.7 mM, 0.8 mM, 0.9 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM veya daha yüksek bir konsantrasyonda bulunabilir..

Bileşimlerin pH'si ve ozmolaritesi, bileşimin istenen aktivitesi ve stabilitesi için koşulları optimize etmek için bu alanda uzman olanlar tarafından ayarlanabilir. Bazı örneklerde, burada sunulan bileşimlerin ozmolaritesi 100 mOsm/kg ila 500 mOsm/kg aralığında, örneğin en az veya en az yaklaşık veya yaklaşık veya 100 mOsm/kg, 120 mOsm/kg, 140 mOsm/kg, 160 mOsm/kg, 180 mOsm/kg, 200 mOsm/kg, 220 mOsm/kg, 240 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 300 mOsm/kg, 320 mOsm/kg, 340 mOsm/kg, 360 mOsm/kg, 380 mOsm/kg, 400 mOsm/kg, 420 mOsm/kg, 440 mOsm/kg, 460 mOsm/kg, 500 veya daha fazla mOsm/kg'dir ve pH'si 6 ila 8, örneğin 6 ila 7.4 aralığında veya yaklaşık bu aralıkta, örneğin yaklaşık veya 6, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 veya 8'dir.

Genellikle, NaCl burada, örneğin 100 mM ila 150 mM aralığında veya yaklaşık bu aralıkta veya daha fazla olan bir miktarda bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim içeren formülasyonlarda sunulmaktadır. Örneğin, bir örnek formülasyon yaklaşık veya 10 mM histidin ve/veya yaklaşık veya 130 mM NaCl içerebilir. Başka formülasyonlar ayrıca veya alternatif olarak, örneğin yaklaşık veya 13 mg/mL laktoz içerebilir. Ayrıca, formülasyonda sınırlandırıcı olmamak koşuluyla tiomersal de dâhil olmak üzere bir antibakteriyel veya antifungal madde bulunabilir. Formülasyonlar ayrıca Albümin, Pluronic® F68, TWEEN® ve/veya başka deterjan içerebilir. Formülasyonlar yaklaşık veya 6.0 ila 7.4, örneğin en az 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3 veya 7.4 olan, genellikle yaklaşık veya pH 6.5 olan bir pH'de sunulmaktadır. Burada kullanım için modifiye edilmiş bir çözünür

hiyalüronidazın konsantre formülasyonları, uygun tuz konsantrasyonunu korumak için uygulamadan önce genellikle bir salin çözeltisi veya başka tuz tamponlu çözelti içinde seyreltilir.

b. Kontrol Noktası İnhibitör Formülasyonları

Burada sunulan bileşimlerde veya bileşimlerin kombinasyonlarında, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü doğrudan uygulama için 7.5 mg ila yaklaşık 5,000 mg, about 7.5 mg ila yaklaşık 1,500 mg, yaklaşık 7.5 mg ila yaklaşık 750 mg veya yaklaşık 22.5 ila yaklaşık 750 mg aralığındaki veya yaklaşık bu aralıktaki bir miktarda formüle edilir. Bazı örneklerde, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü örneğin daha sık uygulama için bir düşük doz formülasyonu olarak formüle edilebilir. Bu tür formülasyonlarda, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü tek dozaj uygulaması için 1 mg, 500 µg, 400 µg, 300 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg, 30 µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg veya 1 µg'den az veya yaklaşık bu miktardan az bir miktarda formüle edilir. Dolayısıyla doğrudan uygulama için formüle edilen bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün sınırlandırıcı olmayan miktarları 1 µg 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg,, 250 µg, 500 µg, 1 mg, 5 mg, 7.5 mg, 10 mg, 20 mg, 22, 5 mg, 30 mg, 35 mg, 37.5 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 210 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 375 mg, 500 mg, 750 mg, 1000 mg, 1500 mg, 2000 mg, 2500 mg, 3000 mg, 3500 mg, 4000 mg, 4500 mg veya 5000 mg veya yaklaşık bu miktar olan bir dozajı içerir.

Bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor gibi bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü içeren formülasyonlar, hacim için ağırlıkça yüzde olarak verilebilir. Bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün bu konsantrasyonları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, ağırlık/hacim olarak %0.01 ila %99.5 veya yaklaşık bu aralıkta, örneğin ağırlık/hacim olarak %0.1 ila %90, %0.1 ila %70, %0.1 ila %30 veya %5 ila %22 aralığında veya yaklaşık bu aralıkta olan bir konsantrasyon yer alır. Örneklerde, bileşimlerdeki bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü 0.5 mg/mL ila 500 mg/mL, örneğin 0.5 mg/mL ila 250 mg/mL, 0.5 mg/mL ila 100 mg/mL, 0.5 mg/mL ila 50 mg/mL, 0.5 mg/mL ila 10 mg/mL, 0.5 mg/mL ila 6 mg/mL, 0.5 mg/mL ila 2 mg/mL, 2 mg/mL ila 250 mg/mL, 2 mg/mL ila 100 mg/mL, 2 mg/mL ila 50 mg/mL, 2 mg/mL ila 10 mg/mL, 2 mg/mL ila 6 mg/mL, 6 mg/mL ila 250 mg/mL, 6 mg/mL ila 100 mg/mL, 6 mg/mL ila 50 mg/mL, 6 mg/mL ila 10 mg/mL, 10 mg/mL ila 250 mg/mL, 10 mg/mL ila 100 mg/mL, 10 mg/mL ila 50 mg/mL, 50 mg/mL ila 250 mg/mL, 50 mg/mL ila 100

mg/mL veya 100 mg/mL ila 250 mg/mL aralığında veya yaklaşık bu aralıkta olan bir konsantrasyonda temin edilebilir. Örneğin, bileşimde bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü en az 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL, 120 mg/mL, 150 mg/mL, 180 mg/mL, 200 mg/mL, 220 mg/mL, 250 mg/mL veya daha fazla olan bir konsantrasyonda temin edilebilir. Bazı durumlarda, formülasyondaki bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü en az %1 (10 mg/mL) ila %30 (300 mg/mL) miktarında, örneğin en az %1, %2, %3, %4, %5, %6, %7, %8, %9, %10, %11, %12, %13, %14, %15, %16, %17, %18, %19, %20 21, %22, %23, %24, %25, %26, %27, %28, %29, %30 veya daha fazla olan bir miktarda temin edilir.

Bileşimin hacmi 0.5 mL ila 1000 mL, örneğin 0.5 mL ila 100 mL, 0.5 mL ila 10 mL, 1 mL ila 500 mL, 1 mL ila 10 mL, örneğin en az veya yaklaşık en az veya yaklaşık veya 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL veya daha fazla olabilir. Uygulandığında, bileşim infüzyonla uygulanabilir. Daha büyük hacimler için, infüzyon süresi daha büyük hacmin tatbikini kolaylaştırmak için adapte edilebilir. Örneğin infüzyon süresi en az 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika, 20 dakika, 30 dakika, 40 dakika, 50 dakika, 1 saat, 2 saat veya daha fazla olabilir.

Burada sunulan antikor terkipleri tek veya çoklu dozaj kullanımı için farmasötik bileşimler olarak formüle edilebilir. Tipik olarak, antikor, kullanıma hazır ve daha fazla seyreltmeyi gerektirmeyen bir miktarda formüle edilir. Formülasyonun tek veya çoklu dozaj formülasyonu olarak sunulmasına bağlı olarak, bu alanda uzman olanlar formülasyondaki tam antikor miktarını ampirik olarak belirleyebilirler.

Antikor formülasyonlarının taşıyıcılar, polimerler, lipitler ve başka eksipiyanlar da dâhil olmak üzere başka bileşenler içerebileceği takdir edilecektir. Yukarıdaki dozaj konsantrasyonları etken bileşen olan antikor bileşenine göredir.

3. Ambalajlama ve İmalat Ürünleri

Ayrıca ambalaj malzemeleri, burada sunulan herhangi bir farmasötik bileşim veya kombinasyon ve bileşimlerin ve kombinasyonların en azından orta ila yüksek seviye HA fenotipine sahip katı tümörlerle özellik kazanan kanserler gibi kanserlerin tedavisi için kullanılacağını belirten bir etiket içeren imalat ürünleri açıklanmaktadır. Örnek imalat

ürünleri tek bölmeli ve çift bölmeli kaplar da dâhil olmak üzere kaplardır. Kaplar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla tüpler, şişeler ve şırıngalar yer alır. Kaplar ayrıca subkütanöz uygulama için bir iğne içerebilir.

Bir örnekte, imalat ürünü polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim gibi anti-hiyalüronan madde ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor) içeren ve başka madde veya tedavi içermeyen bir farmasötik bileşim ihtiva eder. Başka bir örnekte, imalat ürünü anti-hiyalüronan madde (örneğin PEGPH20 gibi polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim), bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor) ve başka bir terapötik madde (örneğin bir kemoterapötik madde) içeren farmasötik bileşimler ihtiva eder. Bu örnekte, maddeler imalat ürünleri olarak ambalajlanmak üzere birlikte veya ayrı ayrı temin edilebilir.

Burada açıklanan imalat ürünleri ambalaj malzemeleri içerir. Farmasötik ürünlerin ambalajlanmasında kullanıma yönelik ambalaj malzemeleri bu alanda uzman olanlar tarafından iyi bilinmektedir. Örneğin bakınız: ABD Patentleri No. 5,323,907, 5,052,558 ve 5,033,252. Farmasötik ambalaj malzemelerinin örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla blister paketleri, şişeler, tüpler, inhalerler, pompalar, torbalar, flakonlar, kaplar, şırıngalar, şişeler ve seçilmiş bir formülasyon ve hedeflenen uygulama ve tedavi biçimi için uygun herhangi bir ambalaj malzemesi yer alır.

Ambalaj seçimi maddelere ve bu bileşimlerin birlikte mi yoksa ayrı ayrı mı ambalajlanacağına bağlıdır. Genellikle, ambalaj, içinde bulunan bileşimlerle reaktif değildir. Başka örneklerde, bileşenlerin bazıları bir karışım olarak ambalajlanabilir. Başka örneklerde, bütün bileşenler ayrı ayrı ambalajlanır. Dolayısıyla örneğin, bileşenler, uygulamadan hemen önce karıştırılarak doğrudan birlikte uygulanabilen ayrı bileşimler olarak ambalajlanabilir. Alternatif olarak, bileşenler ayrı ayrı uygulama için ayrı bileşimler olarak ambalajlanabilir.

Bileşenler bir kap içinde ambalajalanabilir. Bileşenler aynı kap içinde ayrı ayrı ambalajlanır. Genellikle, bu kapların örnekleri arasında polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi içeren kapalı, tanımlı bir alana ve başka bileşenleri veya bileşeni içeren ayrı bir kapalı, tanımlı alana sahip, alanların, kolayca elimine edilebilen, elimine edildiğinde bileşenlerin karışmasına izin veren veya bileşenlerin ayrı ayrı uygulanmasına izin veren bir membranla ayrıldığı kaplar yer alır. Uygulamadan önce

maddelerin diğer bileşenlerden ayrı olması koşuluyla herhangi bir kap veya başka imalat ürünü düşünülmektedir. Uygun örnekler için, örneğin ABD Patentleri No. 3,539,794 ve 5,171,081'de açıklanan kaplara bakınız.

İmalat ürünleri de dâhil olmak üzere seçilmiş bileşimler kitler olarak da temin edilebilir. Kitler burada açıklandığı gibi bir farmasötik bileşim ve bir imalat ürünü olarak temin edilen uygulama için bir ürün içerebilir. Kit isteğe bağlı olarak dozajlar, dozaj rejimleri ve uygulama biçimine ilişkin talimatlar da dâhil olmak üzere uygulama için talimatları içerebilir. Kitler ayrıca burada açıklanan bir farmasötik bileşimi ve tanı için bir ürün içerir.

F. Aktivite, Biyoyararlanım ve Farmakokinetiği İzleme ve Değerlendirme Usulleri

Buradaki bileşimlerdeki maddeler, burada sunulan kombinasyon terapisindeki kullanımlarıyla ilişkili özellikler ve aktiviteler açısından değerlendirilebilir. Özellikler ve aktiviteler biyolojik aktiviteler, tümöre neden olan aktiviteler ve/veya bağışıklık yanıtı aktiviteleriyle ilişkili olabilir. Tahliller *in vitro* veya *in vivo* yapılabilir. Tahliller doz ve uygulama yolunun etkileri de dâhil olmak üzere maddelerin etkilerini değerlendirmek için kullanılabilir.

1. Hiyalüronidaz Aktivitesi

Hiyalüronidaz aktivitesi bu alanda iyi bilinen usuller kullanılarak değerlendirilebilir. Özellikle hiyalüronidaza ilişkin tahliller, ayrışan hiyalüronik asit (hiyalüronan, HA) miktarı ölçülerek belirlenebilir. Tahliller viskozimetrik ve türbidimetrik usulleri içerebilir (Daubenmerkl ve diğerleri (1957) Acta Pharmacol. et Toxicol, 13:1-11). Tahliller ELISA, kromatografi ve kolorimetri usullerini de içerebilir. Bu tahliller bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir. Herhangi bir hiyalüronidazın aktivitesini birim olarak değerlendirmek için, her birinin bir birimi eşdeğer olmak üzere Hiyalüronidaz Referans Standardı (USP), Ulusal İlaç Rehberi (NF) Standart Hiyalüronidaz çözeltisi veya Uluslararası hiyalüronidaz referans standardı kullanılabilir.

Hiyalüronidaz aktivitesini değerlendirmenin türbidimetrik bir usulü, enzim 30 dakika 37°C'de HA ile reaksiyona girmeye bırakıldıktan sonra kalan ayrışmamış hiyalüronik asit veya hiyalüronan (HA) substrat miktarı ölçülerek, Amerika Birleşik devletleri Farmakopesi XXIII-Ulusal İlaç Rehberinde açıklanan usulleri içerebilir (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, MD).

Örneğin aktivite bir mikrotürbidite tahlili kullanılarak ölçülebilir. Bu, hiyalüronik asit serum albüminiyle bağlandığında çözünmez bir çökeltinin oluşmasına dayanır. Aktivite, hiyalüronidaz belirli bir süre (örneğin 10 dakika) sodyum hiyalüronatla (hiyalüronik asit) inkübe edilerek ve sonra sindirilmemiş sodyum hiyalüronat asitlenmiş serum albümini ilavesiyle çöketilerek ölçülür. Elde edilen numunenin türbiditesi ek bir geliştirme döneminden sonra 640 nm'de ölçülür. Sodyum hiyalüronat substrat üzerindeki hiyalüronidaz aktivitesinden kaynaklanan türbiditedeki azalma hiyalüronidaz enzimatik aktivitesinin bir ölçüsüdür.

Başka bir örnekte, hiyalüronidaz aktivitesi, kalıntı biyotinlenmiş hiyalüronik asidin hiyalüronidazla inkübasyonun ardından ölçüldüğü bir mikrotitre tahlili kullanılarak ölçülür (örneğin bakınız: Frost ve Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, ABD Patent Yayını No. 20050260186). Hiyalüronik asidin glukuronik asit kalıntıları üzerindeki serbest karboksil grupları biyotinlenir ve biyotinlenmiş hiyalüronik asit substratı bir mikrotitre plakasına kovalent olarak bağlanır. Hiyalüronidazla inkübasyonun ardından, kalıntı biyotinlenmiş hiyalüronik asit substratı, bir avidin-peroksidaz reaksiyonu kullanılarak saptanır ve bilinen aktiviteye sahip hiyalüronidaz standartlarıyla reaksiyonun ardından elde edilenle karşılaştırılır. Hiyalüronidaz aktivitesini ölçmek için başka tahliller bu alanda bilinmektedir ve buradaki usullerde kullanılabilir (örneğin bakınız: Delpech ve diğerleri, (1995) Anal. Biochem. 229:35-41; Takahashi ve diğerleri, (2003) Anal. Biochem. 322:257-263).

Hiyalüronidazın yayıcı veya dağıtıcı bir madde olarak etki yapma kabiliyeti de değerlendirilebilir. Örneğin tripan mavi boya, çıplak farelerin her bir böğrüne yanal cilde hiyalüronidazla birlikte veya hiyalüronidaz olmadan subkütanöz olarak enjekte edilebilir. Daha sonra boyanmış alan, hiyalüronidazın bir yayıcı madde olarak işlev görme kabiliyetini belirlemek için örneğin bir mikro kumpasla ölçülür (ABD Patenti No. 20060104968).

2. Bağışıklık Sistemi Kontrol Noktası İnhibitörü Aktivitesi

Bir antikor gibi bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün aktivitesi, *in vitro* veya *in vivo* usuller de dâhil olmak üzere bu alanda bilinen usuller kullanılarak değerlendirilebilir. Örneğin *in vitro* tahliller, bir kontrol noktası inhibitörünün hedef kontrol noktası molekülünü (örneğin CTLA4 veya PD-1) bağlama kabiliyetini değerlendirmek için uygulanabilir. Başka *in vitro* tahliller, bir antikor gibi bağışıklık

sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin başka biyolojik aktivitelerini değerlendirmek için kullanılabilir. Örneğin bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün (örneğin bir antikor) bağışıklık sistemi kontrol noktalarını bloke etme ve dolayısıyla bir bağışıklık yanıtını stimüle etme kabiliyeti, kültürlenmiş hücrelerde, örneğin T hücresi aktivasyonu, hücre dışı reseptörler veya sitokinlerin salgılanmasında değerlendirilebilir. Bu aktiviteler sınırlandırıcı olmamak koşuluyla ELISA, Western blot, Northern blot, immünofloresans, immünohistokimya ve markör ekspresyonunu değerlendirmek için akış sitometrisi de dâhil olmak üzere bu alanda bilinen herhangi bir usul kullanılarak değerlendirilebilir.

Özel örneklerde, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinlerine karşı antikorlar, örneğin anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikorları gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri, CTLA4 veya PD-1 gibi, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini antijenine bağlanma kabiliyeti açısından değerlendirilebilir. Bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorlar gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri, bu alanda uzman olanların bildiği herhangi bir usulle bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini bağlama kabiliyeti açısından değerlendirilebilir. Bağlanmayı değerlendirmeye yönelik tahliller arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla katı destek bağlanma tahlilleri, çözelti bağlanma tahlilleri veya hücre bazlı tahliller yer alır. Örnek tahliller arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla yüzey plazmon rezonansı; biyotabaka interferometrisi; western blot'lar, radyoimmün tahliller, ELISA (enzime bağlı immünosorbent tahlili), Meso Scale Discovery (MSD, Gaithersburg, Maryland), "sandviç" bağışıklık tahlilleri, immünopresipitasyon tahlilleri, ELISPOT, presipitin reaksiyonları, jel difüzyonu presipitin reaksiyonları, immünodifüzyon tahlilleri, aglutinasyon tahlilleri, kompleman-fiksasyon tahlilleri, immünoradyometrik tahliller, floresan bağışıklık tahlilleri, protein A bağışıklık tahlilleri, immünofloresans, immünohistokimya veya immünoelektron mikroskopisi gibi bağışıklık tahlilleri; izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC); spektroskopik tahliller ve bu alanda uzman olanların bildiği bağlanmayı değerlendirmek için başka tahliller yer alır.

Karşılık gelen hedef bağışıklık sistemi kontrol noktasına bağlanma, örneğin CTLA4 veya PD-1'e bağlanma değerlendirilebilir. Burada açıklanan bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinlerinin birçoğu membrana bağlı reseptörlerdir. Bu proteinler, proteinin transmembran sahası gibi membrana bağlı bölgesinin, membranla birleşme sahasını uzaklaştırmak ve proteini çözünür hale getirmek için, örneğin kodlayıcı nükleik asidin proteolitik yarılmasıyla veya rekombinant ekspresyonuyla modifiye edildiği veya uzaklaştırıldığı bir çözünür protein olarak eksprese edilebilir. Bağışıklık sistemi kontrol

noktası proteinlerinin örnek çözünür formları arasında bağışıklık sistemi kontrol noktası proteininin hücre dışı sahasına karşılık gelen peptitler veya bunların çözünür olan ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor) tarafından tanınan bölümü yer alır.

Bağlanma tahlilleri çözeltide, süspansiyonda veya bir katı destek üzerinde yapılabilir. Örneğin, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini veya bunun fragmanı bir katı destek (örneğin bir karbon veya plastik yüzey, bir doku kültürü kabı veya çipi) üzerinde hareketsizleştirilebilir ve bir antikor veya başka bağlayıcı madde gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle temas ettirilebilir. Bağlanmamış inhibitör (örneğin antikor) veya hedef protein yıkanarak uzaklaştırılabilir ve sonra bağlı kompleksler saptanabilir. Bağlanma tahlilleri, spesifik olmayan bağlanmayı azatmaya yönelik koşullar altında, örneğin yüksek iyon gücüne sahip bir tampon (örneğin 0.3-0.4 M NaCl) noniyonik deterjanla (örneğin %0.1 Triton X-100 veya Tween 20) ve/veya blokaj proteinleriyle (örneğin büyükbaş hayvan serum albümini veya jelatin) birlikte kullanılarak yapılabilir. Bu tahlillere referans bağlanmanın bir ölçüsü olarak negatif kontroller dâhil edilebilir. Bağlanma afiniteleri Scatchard analizi (Munson ve diğerleri, (1980) Anal. Biochem., 107:220), yüzey plazmon rezonansı, izotermal kalorimetri, kantitatif ELISA ve bu alanda uzman olanların bildiği başka usuller kullanılarak belirlenebilir (örneğin Liliom ve diğerleri (1991) J. Immunol Methods. 143(1):119-25).

Bazı durumlarda, bağlanma, hedef bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini (örneğin CTLA4 veya PD-1) eksprese ettiği bilinen hücreler kullanılarak değerlendirilebilir. Hücreler, geçici veya kalıcı transfeksiyonla üretilen hücreler, hücre hatları veya primer hücreler olabilir. Örneğin anti-CTLA4 antikorları gibi CTLA'yı bağlayan proteinleri taramak için hücre bazlı tahlillerde kullanılabilen CTLA4 eksprese eden örnek hücre hatları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla kolorektal adenokarsinom hücre hatları HCT-8 (ATCC CCL-244), HT-29 (ATCC HTB-38), COLO 205 (ATCC CCL-222) ve CACO-2 (ATCC HTB-37); meme karsinomu hücre hatları, MCF-7 (ATCC HTB-22), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), T-47D (ATCC HTB-133); akciğer karsinomu hücre hatları, CALU-1 (ATCC HTB-54), CALU-6 (ATCC HTB-56), A549 (ATCC CCL-185); yumurtalık karsinomu hücre hattı, SKOV-3 (ATCC HTB-77); ve rahim karsinomu hücre hattı, C33A (ATCC HTB-31) yer alır. Anti-PD-1 antikorları gibi PD-1'i inhibe eden proteinleri taramak için hücre bazlı tahlillerde kullanılabilen PD-1 eksprese eden örnek

hücre hatları arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla EL4 (ATCC TIB-39) ve Jurkat hücreleri (ATCC TIB-152) yer alır.

Bağlanma floresansla aktive edilen hücre sıralaması (FACS), immünohistokimya veya immünofloresans kullanılarak değerlendirilebilir. Hücre bağlanmasına ek olarak, sınırlandırıcı olmamak koşuluyal T hücresi aktivasyonundaki değişiklikleri, hücre morfolojisindeki değişiklikleri ve/veya bir doğal genin veya bir raportör genin hücresel ekspresyonu gibi transkripsiyonel aktivasyondaki değişiklikleri değerlendirmek için tahliller de dâhil olmak üzere bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor) işlevsel aktivitesini değerlendirmek için bir tahlil kullanılabilir.

Belirli bir fenotipik tahlil için uygun olduğu belirlenen hücreler (yani seçilmiş bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini eksprese ettiği burada açıklanan veya bu alanda bilinen herhangi bir hücre), kontrolün yanı sıra, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor gibi bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle tedavi edilebilir. Bazı örneklerde, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini hedefi bir reseptördür ve reseptörün aktivasyonunu sağlamak için tahlile CD80 veya CD86 (CTLA4 için) veya PD-L1 veya PD-L2 (PD-1 için) gibi ligand dâhil edilir. Tedavi döneminin sonunda, tedavi olan ve olmayan hücreler burada açıklanan veya bu alanda bilinen bir veya daha fazla usulle analiz edilebilir. Bazı örneklerde, burada sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün aktivitesi, hücre morfolojisi, hücre proliferasyonu veya sinyallerdeki değişiklikler ölçülerek değerlendirilebilir. T hücresi aktivasyonu üzerine morfolojideki değişiklikler Wülfing ve diğerleri tarafından (1998) Proc Natl Acad Sci U S A. 95(11):6302-6307'de açıklanmaktadır.

Bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorlar gibi, seçilmiş bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin aktivitesini ölçmek için proliferasyon tahlilleri kullanılabilir. Tahliller, CD80 veya CD86 (CTLA4 için) veya PD-L1 veya PD-L2 (PD-1 için) gibi ligandın varlığında, bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru gibi bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle tedavi üzerine seçilmiş bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini eksprese eden hücrelerin proliferasyonunu ölçebilir. Hücreler, hücrelerin proliferasyon göstermesi için yeterli bir süre (örneğin 12 saat veya 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 gün veya daha uzun süre) inkübe edilebilir. Hücre proliferasyonu, ^{3}H-timidin katılım tahlili, 5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU), ELISA, tetrazolyum mikroplaka tahlili ve asit fosfataz

tahlili dâhil olmak üzere bu alanda bilinen herhangi bir usulle ölçülebilir (örneğin: Maghni ve diğerleri (1999) J. Immunol. Method. 223(2):185-194). Hücre proliferasyonu Invitrogen (Cyquant NF hücre proliferasyonu tahlil kiti), Cambrex (ViaLight HS (yüksek duyarlılık) BioAssay), Promega (CellTiter-Glo Lüminesan Hücre Yaşayabilirliği Tahlili, Guava Technologies (CellGrowth tahili), Stratagene'den (Quantos hücre proliferasyonu tahlili) elde edilen kitler kullanılarak da ölçülebilir (örneğin Assays for Cell Proliferation Studies, *Genetic Eng. Biotechnol. News.* 26(6)). Bazı örneklerde, hücre proliferasyonu, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü içermeyen hücrelerin proliferasyonuna normalize edilebilir. Örnek proliferasyon tahlillerinde, hücreler tahlil edilecek bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünü içeren normal büyüme ortamında 96 kuyucuklu bir plakanın bir kuyucuğuna ilave edilebilir.

Bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorlar, örneğin anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikorları gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, bağlanma aktivitesinin değerlendirilebilmesi ve belirlenebilmesi için işaretlenebilir. Örneğin bağlanmayı saptamak için, anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikorları gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası inibitörü, saptamayı kolaylaştırmak için saptanabilir bir kısım veya etiketle işaretlenebilir. Bu alanda uzman olanlar tahlil koşulları için uygun bir saptanabilir kısmı veya etiketi seçebilirler. Örneğin beşeri serum içeren bir çözeltideki bir antikor olan modifiye edilmiş bir proteinin bağlanmasını saptamak için anti-Ig antikorları gibi bazı ikincil tepkime maddeleri kullanılamaz. Ayrıca, bir anti-IgG antikoru, bir antikor olan bir biyomolekülün bağlanmasını saptamak için kullanılamaz.

Saptanabilen veya tanımlanabilen herhangi bir saptanabilir kısım veya bu alanda uzman olanların bildiği başka bir kısım kullanılabilir. Kısım veya etiket doğrudan veya dolaylı olarak, örneğin bir bağlayıcı kullanılarak bir terapötik protein veya antikor gibi test molekülüne bağlanabilir. Bağlanma terapötik antikorun N veya C terminalinde olabilir. Kullanılabilecek örnek etiketler ve kısımlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Tablo 5'te verilenlerin herhangi biri yer alır.

Tablo 5. Örnek etiketler ve kısımlar				
Ad	**Dizi**	**Kalıntı sayısı**	**Büyüklük (Da)**	**DİZİ İD NO**
c-Myc	EQKLISEEDL	10	1200	19
FLAG	DYKDDDDK	8	1012	20
His	HHHHHH	6		31
HA	YPYDVPDYA	9	1102	32
VSV-G	YTDIEMNRLGK	11	1339	42
HSV	QPELAPEDPED	11	1239	43
V5	GKPIPNPLLGLDST	14	1421	44
Poly Arg	RRRRR	5-6	800	45
Strep-tag-II	WSHPQFEK	8	1200	46
S	KETAAAKFERQHMDS	15	1750	47
3x FLAG	DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	22	2730	48
HAT	KDHLIHNVHKEFHAHAHNK	19	2310	49
SBP	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQ LRARLEHHPQGQREP	38	4306	50

Saptanabilir kısmı burada açıklanan terapötik antikorlara bağlayabilen, bu alanda uzman olanların bildiği herhangi bir bağlayıcı kullanılabilir. Örnek bağlayıcılar arasında, n'nin pozitif bir tamsayı, örneğin 1 (DİZİ İD NO: 37), 2 (DİZİ İD NO: 38), 3 (DİZİ İD NO: 39), 4 (DİZİ İD NO: 40), 5 (DİZİ İD NO: 41) veya daha yüksek olduğu glisin açısından zengin esnek bağlayıcılar $(-G_4S-)_n$ yer alır.

3. Kombinasyon Terapisinin Kansere Karşı Aktivitesi

Tümörü, hastanın genel sağlık durumunu ve/veya hastalığın hastadaki seyrini izleyerek, kombinasyon tedavisinin etkinliğini belirlemek için hasta insanlar veya insan dışı denekler veya hayvan tümör modelleri kullanılabilir. Burada sunulan kombinasyon terapisinin etkinliğini değerlendirmek için, sınırlandırıcı olmamak koşuluyla tümör büyüklüğünün izlenmesi, tümör antijenine karşı antikor titresinin izlenmesi, metastazların varlığı ve/veya

büyüklüğünün izlenmesi, hastanın lenf düğümlerinin izlenmesi ve hastanın ağırlığının ve kan ve idrar markörleri de dâhil olmak üzere sağlıkla ilişkili başka göstergelerin izlenmesi de dâhil olmak üzere çeşitli izleme aşamalarının herhangi biri dâhil edilebilir.

Ayrıca sunulan kombinasyonlarının uygulanmasının ardından bağışıklık yanıtı değerlendirilebilir. Burada sunulan kombinasyonlar, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinlerini inhibe ederek bir bağışıklık yanıtını aktive eder. Bir bağışıklık yanıtının aktivasyonu, geleneksel olarak kanserleri tedavi etmek için kullanılan sitotoksik terapilerden alınan klinik yanıtlardan farklı olan klinik aktiviteleri ortaya çıkarır. Örneğin, tümör büyüklüğündeki bir azalma veya tümör büyümesindeki gecikme gibi, sitotoksik terapilere verilen klinik yanıtların, tedavinin ilk haftaları içinde gözlemlenmesi beklenir. Buna karşılık, bir tümörü tedavi etmek için bağışıklık sistemini aktive eden tedaviler uygulanan hastalar, tedavinin ardından ilk haftalardaki veya aylardaki stabil, hatta ilerleyici tümör büyümesinin ardından gecikmiş bir yanıt gösterebilir. Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri, tedavinin kesilmesinin ardından uzun bir süre devam eden tümöre karşı bir yanıt da sağlayabilir. Örneğin, bir bağışıklık noktası kontrol noktası proteininin inhibisyonunun ardından, tedavinin kesilmesinden sonra aylarca veya yıllarca kalıcı yanıtlar ölçülebilmektedir.

Burada açıklandığı gibi PEGPH20 gibi polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimlerin ve bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorlar, örneğin anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikorları gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin, tek tek ve/veya kombinasyon halinde terapötik aktivitesini değerlendirmek için hayvan modellerinin veya hasta insanların veya insan dışı deneklerin kullanıldığı *in vivo* çalışmalar yapılabilir. Özel örneklerde, polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin (örneğin PEGPH20) ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün (örneğin anti-CTLA4 veya anti-PD-1) birleşimsel aktivitesi değerlendirilir. Burada başka yerlerde açıklandığı gibi, tipik olarak maddeler ayrı ayrı uygulanır, böylece hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin PEGillenmiş bir çözünür hiyalüronidaz gibi PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim) bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitöründen önce uygulanır.

Bazı örneklerde, PEGPH20 gibi polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorun (örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-2 antikoru) kombinasyon tedavisini değerlendirmek için hayvan kanser modelleri kullanılır. Bu hayvan

modelleri, sunulan kombinasyonların ardından bağışıklık yanıtı aktivasyonu değerlendirilerek ve/veya tümör oluşumu inhibisyonu, tümör gerilemesi veya metastaz ölçülerek kanser hastalarında kombinasyon tedavisinin etkinliğini öngörmek için kullanılabilir. Bu hayvan modelleri, burada sunulan kombinasyon terapisi antikorlarının yan etkilerini değerlendirmek için de kullanılabilir.

Özel örneklerde, kombinasyon terapisinin terapötik etkinliği, orta ila yüksek HA içeriğine sahip olmakla özellik kazanan tümöreri, örneğin $HA^{yüksek}$ (veya HA+3) tümörleri tedavi etmek açısından değerlendirilir. Bir tümörün HA içeriğini belirlemenin ve derecelendirmenin usulleri burada Bölüm H'de açıklanmaktadır. Hasta insanlar tedavi için seçilebilir ve kombinasyon terapisinin terapötik etkinliği değerlendirilebilir veya izlenebilir. Başka durumlarda, bir $HA^{yüksek}$ tümörü olan hayvan modelleri (örneğin fare ksenogreft veya allogreft modelleri) oluşturulabilir. Bazı örneklerde, fare kanser modelini oluşturmak için farelere enjekte edilen hücreler, hücre hattı tarafından oluşturulan tümörün bir $HA^{yüksek}$ tümör olacağı şekilde yüksek hiyalüronan seviyeleri üretmek üzere tasarlanır. Bu hücre hatları, hiyalüronan sentaz 1 (HAS1; DİZİ İD NO: 51'de verilmektedir), hiyalüronan sentaz 2 (HAS2; DİZİ İD NO: 52'de verilmektedir) veya hiyalüronan sentaz 3 (HAS3; DİZİ İD NO: 2'de verilmektedir) gibi bir veya daha fazla hiyalüronan sentaz enzimini kodlayan bir veya daha fazla eksojen gen kalıcı bir şekilde dâhil edilerek oluşturulabilir.

a. Tümör Büyümesi ve Hacmi

Sunulan kombinasyonların uygulanmasının ardından tümör büyümesi inhibisyonu, tümör gerilemesi veya metastaz ölçülerek kombinasyon tedavisinin etkinliğini belirlemek için hasta insanlar veya insan dışı denekler veya hayvan tümör modelleri kullanılabilir. Bunlar arasında terapötik etkinliğin bir göstergesi olarak bir tümörün büyümesindeki veya hacmindeki bir azalmayı değerlendirmek üzere tümör büyümesinin ve hacminin izlenmesi yer alabilir. Örneğin hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin hiyalüronidaz), örneğin polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin PEGPH20 gibi PEGillenmiş hiyalüronidaz) ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorun formülasyonları, tümörü olan bir hayvana uygulanabilir ve vücut ağırlıkları ve tümör hacimleri izlenebilir. Hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin önceden uygulanmasının zamanlaması, kombinasyon terapisi için optimal dozaj rejimini değerlendirmek için ayarlanabilir.

Burada sunulan kombinasyon terapisinin aktivitesi, tümör oluşumuna karşı veya tümör hücrelerini tahrip edici aktivite, örneğin tümör büyüklüğündeki azalma ve/veya tümör ilerlemesindeki gecikme izlenerek değerlendirilebilir. Dolayısıyla örneğin, tümör büyüme hızını düşürenleri veya tümör büyüklüğünü azaltanları belirlemek için kombinasyon terapileri değerlendirilebilir. Tümör büyüklüğü, burada sunulan kombinasyonların herhangi biriyle tedavi edilen, tümörü olan insanlarda veya hayvan modellerinde *in vivo* değerlendirilebilir. Tümör küçülmesi veya tümör büyüklüğü ağırlık, hacim veya fiziksel ölçüm gibi bu alanda bilinen çeşitli tahlillerle değerlendirilebilir.

Tümörü olan hayvan modelleri oluşturulabilir. Bir fare veya sıçan tümör hücre hattı karşılık gelen immünokompetan (bağışıklık sistemi sağlam) fare veya sıçan türüne inoküle edilerek (örneğin subkütanöz enjeksiyonla) üretilen sinjenik tümörler, hayvan modeline implante edilen bir primer tümörün metastazıyla oluşan metastatik tümörler, tümör hücrelerinin, tümör hücrelerinin kaynağıyla aynı türe implantasyonuyla oluşturulan allogreft tümörler, beşeri kanser hücre hatlarının veya katı tümörlerin bağışıklık sistemi bozulmuş bir fareye (örneğin çıplak fareler) nakledilmesiyle oluşturulan ksenogreft tümörler ve hayvanın genetik manipülasyonuyla oluşturulan spontan tümörler dâhil olmak üzere *in vivo* tümörler bilinen herhangi bir usulle oluşturulabilir. Tümör modelleri ortotopik olarak, tümör hücrelerinin kaynaklandıkları doku veya organ içine enjeksiyonuyla, örneğin meme tümörü hücrelerinin bir fare meme yağ pedine implantasyonuyla oluşturulabilir.

Tipik olarak, sinjenik veya allogreft hayvan modelleri kullanılır. Bu modellerde hayvanlar immünokompetandır. Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin kullanıldığı kombinasyon tedavisine yanıt olarak bağışıklık sisteminin aktivasyonunu değerlendirmek için sağlam bir bağışıklık sistemi gereklidir. Bir immünokompetan hayvanda bir ksenogreftle ilişkili bir bağışıklık yanıtının reddini ve uyarılmasını önlemek için sinjenik veya allojenik hücreler (yani aynı genetik temelden hücreler) kullanılır. Sinjenik tümör fare modellerinin sınırlandırıcı olmayan örnekleri aşağıda Tablo 6'da verilmektedir.

Tablo 6: Sinjenik Fare Tümör Modeli		
Tümör Tipi	**Hücre Hattı Adı**	**Fare Cinsi**
Karsinom	CT26.CL25	BALB/c
Karsinom	CT26.WT	BALB/c
Karsinom	MTC-M	BALB/c
Rahim ağzı karsinomu	U14	ICR
Karaciğer karsinomu	H22	ICR
Akciğer karsinomu	Lewis	C57BL6
Akciğer karsinomu	K7M2	BALB/c
Melanom	B16F1, B16F10, B16BL6	C57BL6
Miyelom	P3X63Ag8.653	BALB/c
Sarkom	S180	ICR
Sarkom	A20	BALB/c

Bazı örneklerde, tümörler, herhangi bir tümör hayvan modeline ve tipik olarak bir immünokompetan konakçıya (sinjenik) sağ tibial periosteuma bitişik olarak, koltuk altına bir tümör hücre süspansiyonunun (örneğin 2 x 10^5 hücre/hayvan) intramüsküler enjeksiyonuyla oluşturulabilir. Hayvan modelleri arasında maymunlar ve fareler de dâhil olmak üzere bir memeli gibi, burada açıklanan veya bu alanda bilinen herhangi bir organizma yer alır. Bazı örneklerde, sunulan kombinasyonların testleri, tümöre karşı terapötik etkinliğin değerlendirilmesini kolaylaştırmak için primatlardaki (örneğin sinomolgus maymunu modeli) etkinliğin incelenmesini içerebilir. Ek primat modelleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Hint Şebeğinin kullanıldığı modeller yer alır.

Bazı örneklerde, tümörün alıcısı herhangi bir uygun murin cinsi olabilir. Tümör hücrelerinin nakledilebildiği hayvanların örnekleri arasında BALB/c fareleri, C75BL/6 fareleri yer alır. Diğer örnekler arasında transgenik fareler (knock-in'ler (hedeflenmiş genomik bölgelere özgün cDNA dizilerinin sokulduğu fareler) ve knockout'lar (geni çıkarılmış fareler)) yer alır. Örneğin burada sunulan kombinasyon terapisi bir fare kanser modelinde, örneğin bir sinjenik tümör fare modelinde test edilebilir. Bu usulde,

kombinasyon terapisinin tümör büyümesini ve/veya metastazı azaltma veya inhibe etme kabiliyetini belirlemek için, bir sinjenik tümör veya tümör hücre hattı bir fareye aşılanır veya enjekte edilir ve daha sonra fare bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim (örneğin polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim gibi bir hiyalüronidaz, örneğin PEGillenmiş bir çözünür hiyalüronidaz (örneğin PEGPH20)) ve bir antikor (örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru) gibi bağışıklık noktası kontrol noktası proteinini bloke/inhibe eden bir maddeyle tedavi edilir.

Tümör büyüklüğü ve hacmi bu alanda uzman olanların bildiği teknikler esas alınarak izlenebilir. Örneğin tümör büyüklüğü ve hacmi radyografi, ultrason görüntüleme, nekropsi, kumpaslar kullanılarak, mikroCT'yle veya ^{18}F-FDG-PET'le izlenebilir. Tümör büyüklüğü görsel olarak da izlenebilir. Özel örneklerde, tümör büyüklüğü (çap) doğrudan kumpaslar kullanılarak ölçülür. Başka örneklerde, tümör hacmi, kumpas veya ultrason değerlendirmeleriyle elde edilen tümör çapı (D) ölçümlerinin bir ortalaması kullanılarak ölçülebilir. Hacim $V = D^3 \times \pi/6$ formülünden (kumpaslar kullanılarak ölçülen çap için); $V = [\text{uzunluk} \times (\text{genişlik})^2]/2$, burada uzunluk en uzun çaptır ve genişlik uzunluğa dik en kısa çaptır; veya $V = D^2 \times d \times \pi/6$ formülünden (d'nin derinlik veya kalınlık olduğu, ultrason kullanılarak ölçülen çap için) belirlenebilir. Örneğin tümör uzunluğu (l) ve genişliği (w) kumpasla ölçülebilir ve tümör hacmi uzunluk x genişlik^2 x 0.52 olarak hesaplanır.

Başka bir örnekte, tümör hacimleri ultrasonla ölçülür. Böyle bir örnekte, hayvanlara hafif izofluran anestezisi uyglanabilir ve ilgilenilen bölge ultrason jeliyle sıvanır. Tarama başlığı ilgilenilen bölge üzerine yerleştirilir ve tümörün merkezi 2D Kipinde ultrasonla (örneğin bir VisualSocnics Vevo 2100 ultrason kullanılarak) bulunur. Daha sonra 3D kipinde bir görüntü yakalanır ve mm^3 olarak hacmi hesaplamak için tümör hacmi analiz edilir (örneğin Vevo 2100 v1.5.0 görüntüleme yazılımı kullanılarak).

Başka bir örnekte, tümör hacmini ölçmek için microCT taramaları kullanılabilir (örneğin bakınız: Huang ve diğerleri (2009) PNAS, 106:3426-3430). Böyle bir örnekte, farelere Optiray Pharmacy ioversol enjeksiyonu %74 kontrast madde (örneğin 741 mg ioversol/mL) enjekte edilebilir, farelere anestezi uygulanır ve CT taraması bir MicroCat 1A tarayıcı veya başka bir benzer tarayıcı (örneğin IMTek) kullanılarak yapılır (40 kV, 600 µA, 196 dönüş aşamaları, toplam açı veya dönme = 196). Görüntüler yazılım (örneğin RVA3 yazılım programı; ImTek) kullanılarak yeniden oluşturulur. Tümör hacimleri

mevcut yazılım (örneğin Amira 3.1 yazılım; Mercury Computer Systems) kullanılarak belirlenebilir.

İmplante edilen tümörler önceden belirlenmiş bir büyüklük veya hacme ulaşınca, kombinasyon terapisi uygulanabilir. İlerleyen tümörler görselleştirilebilir ve tümör büyüklüğü ve tümör hacmi bu alanda uzman olanların bildiği herhangi bir teknik kullanılarak ölçülebilir. Örneğin tümör hacmi veya tümör büyüklüğü burada açıklanan tekniklerin herhangi biri kullanılarak ölçülebilir. Tümör hacmi ve büyüklüğü, burada sunulan kombinasyonunun uygulanmasının ardından belirli bir süre periyodik aralıklarla, örneğin enfeksiyondan sonra en az veya en fazla veya saatte bir, 6 saatte bir, 12 saatte bir, 24 saatte bir, 36 saatte bir, 2 günde bir, 3 günde bir, 4 günde bir, 5 günde bir, 6 günde bir, 7 günde bir, 2 haftada bir, 3 haftada bir, ayda bir veya daha uzun aralıklarla değerlendirilebilir veya ölçülebilir. Tümör hacminde zaman içinde ortaya çıkan medyan değişikliğin bir grafiği çizilebilir. Toplam eğri altındaki alan (AUC) hesaplanabilir. $AUC_{\text{kontrol hayvanları}}$ - $AUC_{\text{tedavi edilmiş hayvanlar}}$/$AUC_{\text{kontrol hayvanları}}$ x 100 formülü kullanılarak bir terapötik indeks de hesaplanabilir. Kontrol hayvanları tedavi edilmemiş (taşıyıcıyla tedavi edilmiş) hayvanlar, bir izotop kontrol antikoru gibi bir kontrol terapisiyle tedavi edilmiş hayvanlar veya tek başına polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle (örneğin PEGPH20) veya tek başına bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor) tedavi edilen hayvanlar olabilir.

Tümör büyümesi inhibisyonu (TGI), seçilen bir zaman noktasında, aşağıdaki formülle test hayvanlarının ortalama tümör hacmi kullanılarak hesaplanabilir: 1-(ortalama tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{son gün})}$-ortalamatümör hacmi, test ürünü$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$)/(ortalama tümör hacmi, kontrol$_{(\text{son gün})}$-ortalama tümör hacmi, kontrol$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$) x %100, burada test ürünü, tek tek veya bir kombinasyon terapisi olarak polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin, örneğin PEGPH20'nin ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorun (örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru) uygulanmasıdır, burada polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırı enzim (örneğin PEGPH20) ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor) burada açıklandığı gibi aynı zamanda veya ardışık olarak uygulanır. Özel örneklerde, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor (örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru), PEGPH20 gibi

polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin uygulanmasından sonra uygulanır. Kontrol tümörleri tedavi edilmemiş (taşıyıcıyla tedavi edilmiş) hayvanlar, bir izotop kontrol antikoru gibi bir kontrol terapisiyle tedavi edilmiş hayvanlar veya tek başına polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle (örneğin PEGPH20) veya tek başına bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörüyle (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor) tedavi edilmiş hayvanlardan alınan tümörlerdir.

Burada sunulan kombinasyon terapilerinin aktivitesinin değerlendirilmesi, kontrolle tedavi edilmiş veya tedavi edilmemiş, tümörü olan hayvanlara kıyasla tümör büyüklüğündeki (örneğin çap), hacim veya ağırlığındaki bir azalmaya aracılık eden dozajların veya dozaj rejimlerinin belirlenmesini içerebilir. Kontrolle tedavi edilmiş veya tedavi edilmemiş, tümörü olan hayvanlara kıyasla tümör büyüklüğü, hacmi veya ağırlığındaki bir azalmanın, kombinasyon terapisinin, gözlemlenen tümör gerilemesine veya küçülmesine aracılık ettiğini veya kombinasyon terapisinin kontrolle tedavi edilmiş veya tedavi edilmemiş, tümörü olan hayvanlara kıyasla tümör ilerlemesindeki bir gecikmeye aracılık ettiğini belirttiği takdir edilecektir. Tümör küçülmesi veya tümör ilerlemesindeki gecikme tümör oluşumunu engelleyiciliği gösteren parametrelerdir.

Değerlendirme, hayvanların 1.0'dan yüksek, örneğin 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 veya daha yüksek olan, kontrol tümörü:tedavi edilen tümör oranı olarak hesaplanan bir tümör küçülmesi oranı göstermesine yol açan bir kombinasyon terapisinin belirlenmesini içerebilir. Özel örneklerde, sonuçlar tedavi sırasında toplam AUC alanının bir oranı olarak sunulmaktadır (kontrol hayvanlarında tümör büyüklüğü veya hacminin AUC'si/tedavi edilen hayvanlarda tümör büyüklüğü veya hacminin AUC'si). Örneğin bir kombinasyon terapisi, bir denekte AUC ile ölçüldüğünde 1.1'den yüksek, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 veya daha yüksek bir tümör küçülmesi oranına yol açabilir. 1.2 veya 5 oranının, kombinasyon terapisinin, tümör büyüklüğü veya hacminde bir azalmayı belirttiği ve referansa veya kontrole kıyasla %120 veya %500 tümör oluşumuna karşı aktiviteyle sonuçlandığı takdir edilecektir.

Özel örneklerde, terapötik indeks, sunulan bir kombinasyon terapisinin tümör büyüklüğü veya hacmi üzerindeki etkilerinin bir ölçüsü olarak belirlenir. Burada sunulan bir kombinasyon terapisinin terapötik indeksi bir kontrolün terapötik indeksiyle kıyaslandığında en az veya yaklaşık en az veya %120, %130, %140, %150, %160, %170,

%180, %190, %200, %250, %300, %400, %500, %600, %700, %800 veya daha fazla olabilir.

Ek örneklerde, tümörler hayvanlardan alınabilir ve tartılabilir. Burada sunulan bir kombinasyonun uygulanması, tümörü olan kontrol hayvanlarından alınan tümörlere kıyasla tümör ağırlığında bir azalmaya yol açabilmektedir. Ağırlık aynı uygulama sonrası zamanda kontrolle tedavi edilen hayvanlardan alınan tümörlerle de karşılaştırılabilir. Ağırlıktaki değişiklik tümör ağırlığının bir oranı (kontrol hayvanlarının tümör ağırlığı/tedavi edilen hayvanların tümör ağırlıkları) olarak sunulabilir. Burada sunulan bir kombinasyon terapisi, deneklerin, 1.0'dan yüksek, örneğin 1.1'den yüksek, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 veya daha yüksek olan bir kontrol:tedavi edilen tümör ağırlığı oranı göstermesiyle sonuçlanabilmektedir. 1.2 veya 5 olan bir tümör ağırlığı oranının, kombinasyon terapisinin tümör ağırlığında bir azalma sağladığı ve referans veya kontrole kıyasla %120 veya %500 tümör oluşturmaya karşı aktiviteyle sonuçlandığı anlamına geldiği takdir edilecektir.

Kombinasyon terapisinin etkinliği, tümöre karşı terapötik maddelerin değerlendirilmesi için nesnel bir yanıt kriteri sağlayan kılavuz ilkelere göre de değerlendirilebilir. Bu kılavuz ilkeler bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir. Örneğin yayımlanmış kılavuz ilkeler arasında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayımlananlar (bakınız: Dünya Sağlık Örgütü, "WHO Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment," (1979) WHO Offset Publication No. 48, Cenevre, sayfa 1-45 ve Miller ve diğerleri, (1981) Cancer. 47:207-214) ve Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST-Katı Tümörlerde Yanıt Değerlendirme Kriterleri) (Eisenhauer ve diğerleri, (2009) Eur J Cancer. 45(2):228-247) olarak yayımlananlar yer alır. Bu kılavuz ilkeler, tedaviler sırasında kanser hastalarındaki tümörlerin ne zaman düzelme gösterdiğini ("yanıt verdiğini"), aynı kaldığını ("stabilize olduğunu") veya kötüleştiğini ("ilerlediğini") tanımlar. Bu kriterler sadece tümör fenotipleri için geçerlidir ve bir hastanın düzelme gösterip göstermediğinin bir ölçüsü değilir. Tedaviyi uygulayan bir doktor, kılavuz ilkelerde açıklanan nesnel ölçümler ve hastanın semptomatik kriterlerinin bir kombinasyonunu kullanarak hastalığın tedavisini değerlendirir.

Örneğin, tümörler üzerindeki terapötik etkinliği değerlendirmek için sınırlandırıcı olmayan kılavuz ilkelere göre, tümör yanıtının değerlendirilmesi, bütün tutulan organları temsil edici olan, organ başına 5 tümöre kadar ve toplam 10 tümöre kadar ölçüm için seçimi

içerebilir. Tümörler büyüklüklerine (yani çapı en uzun olanlar) ve görüntüleme teknikleri veya klinik tekniklerle doğru tekrarlanan ölçümler için uygunlulukları temelinde seçilebilir. WHO için, en büyük iki dik çapın çarpımlarının toplamı (SPD) ve RECIST için, her tümör için en uzun çapın (LD) toplamı hesaplanabilir ve sırasıyla referans SPD veya referans toplam LD olarak bildirilebilir. Referans SPD veya referans toplam LD, değerlendirme için tümör yanıtının karşılaştırıldığı referanstır. Ölçüm için seçilmeyen başka tümörlerin, yani "hedef olmayan" tümörlerin varlığı da RECIST kılavuz ilkeleri kapsamında kaydedilir.

Tümörler herhangi bir tekrarlanabilir usulle ölçülebilir. Tümör büyüklüğünü ölçmek için örneğin dilim kalınlığı 10 mm veya daha az olan parçaların kullanıldığı CT (bilgisayarlı tomografi) veya MRI (manyetik rezonans görüntüleme) veya 5 mm sürekli rekonstrüksiyon algoritmasının kullanıldığı spiral CT kullanılabilir. Bazı örneklerde, tümörler göğüs röntgeni veya ultrasonuyla ölçülebilir. Tümörleri endoskopi veya laparoskopiyle ölçmek de mümkün olabilir.

Bir klinik çalışma tamamlandığında ve/veya bir klinik çalışmanın önceden belirlenmiş ara zaman noktalarında, SPD veya toplam LD hesaplanabilir ve yanıt aşağıdaki gibi değerlendirilebilir. Ölçülen bütün tümörlerin yok olması bir Tam Yanıt (CR) olarak tanımlanır. WHO için, yok oluşun en az 4 hafta aralıklı iki ardışık gözlemde tespit edilmesi gerekir. Referans olarak sırasıyla referans PSD veya referans toplam LD kullanılarak, SPD'de en az %50'lik bir azalma (WHO) veya LD toplamında %30 azalma (RECIST) olduğunda tümörler Kısmi Yanıt (PR) gösterenler olarak sınıflandırılır. WHO için, tedavinin başından itibaren en küçük SPD'yle (yani en düşük nokta) kıyaslandığında SPD'de en az %25'lik bir artış olduğu ve/veya herhangi bir zaman noktasında hedef olmayan tümörlerde ilerleme olduğu ve/veya yeni tümörler ortaya çıktığı durumda tümör İlerleyici Hastalık (PD) olarak sınıflandırılır. RECIST için, referans olarak tedavinin başlamasından itibaren kaydedilen en düşük toplam LD (yani en düşük nokta) alındığında LD toplamında en az %20'lik bir artış olduğu veya yeni tümörler ortaya çıktığı durumda tümör İlerleyici Hastalık (PD) olarak sınıflandırılır. Tümör küçülmesi %50'den az olduğu, ama tümör büyümesi en düşük noktayla kıyaslandığında %25'i aşmadığı zaman, yeni tümörler olmadığı ve hedef olmayan tümörlerin büyüklüğü artmadığı sürece tümör Stabil bir Hastalık (SD) olarak kabul edilir. Benzer bir şekilde, RECIST kılavuz ilkelerine göre, tümör küçülmesi %30'un altında olduğu, ama LD toplamında %20'yi aşan bir artış

göstermediği zaman, yeni tümörler yoksa ve hedef olmayan tümörlerin büyüklüğünde bir artış yoksa kanser bir SD olarak kabul edilir.

WHO ve RECIST kılavuz ilkeleri, yanıtları izlemek ve sitotoksik tümör terapilerini değerlendirmek için geliştirildi. Yukarıda açıklandığı gibi, immünoterapi tedavileri, sitotoksik tedavilerinkilerden farklı bazı yanıtlara yol açmaktadır. Örneğin tümör yükündeki erken bir artış ve/veya yeni tümörlerin ortaya çıkması RECIST kılavuz ilkelerine göre ilerleyici hastalığa (PD) işaret eder ve ilaç başarısızlığının bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu kılavuz ilkelere dayanan protokollere göre, bir tümör PD olarak sınıflandırıldığında genellikle tedavinin kesilmesi önerilir. Ancak immünoterapilerde, başlangıçta tümör büyüklüğünde bir artış olması, ilaç başarısızlığından çok etkinliği gösteren, bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonunu veya geçici bir enflamatuvar yanıtı işaret ediyor olabilir. Dolayısıyla, immünoterapilere özgü, bağışıklıkla ilişkili yanıt kriterleri (irRC) adı verilen bir dizi kılavuz ilke geliştirilmiştir (Wolchok ve diğerleri, (2009) Clin Cancer Res. 15(23):7412-7420 ve Nishino ve diğerleri, (2013) Clin Cancer Res. 19(14):3936-3943). Dolayısıyla buradaki örneklerde, terapötik etkinlik irRC kılavuz ilkelerine göre veya bu alanda uzman olanların bildiği başka benzer kılavuz ilkelere göre değerlendirilebilir. Kılavuz ilkelerin bir karşılaştırması aşağıda Tablo 7'de verilmektedir.

Tablo 7. Katı tümörleri değerlendirmek için kılavuz ilkeler karşılaştırması				
	İki boyutlu değerlendirme		**Tek boyutlu değerlendirme**	
	WHO	**irRC**	**RECIST**	**irRC**
Ölçülebilir lezyonlar	iki boyutlu ölçümlerle ≥5 × 5 mm^2	iki boyutlu ölçümlerle ≥5 × 5 mm^2	en uzun çapta ≥10 mm	en uzun çapta ≥10 mm
Her lezyonun ölçümü	En uzun çap × en uzun dik çap (cm^2)	En uzun çap × en uzun dik çap (cm^2)	En uzun çap (cm)	En uzun çap (cm)
Tümör yükü (ölçümlerin toplamı)	Hedef lezyonların (sadece) iki boyutlu ölçümlerinin toplamı	Bütün hedef lezyonların ve varsa yeni lezyonların iki boyutlu ölçümlerinin toplamı	Sadece hedef lezyonların en uzun çaplarının toplamı	Bütün hedef lezyonların ve varsa yeni lezyonların en uzun çaplarının toplamı
Yeni, ölçülebilir lezyonlar	Her zaman PD'yi temsil eder	İlerlemeyi tanımlamaz; tümör yüküne dâhil edilir	Her zaman PD'yi temsil eder	Yeni lezyonun/lezyonların varlığı ilerlemeyi tanımlamaz. Yeni lezyonun/lezyonların ölçümleri ölçümlerin toplamına ilave edilir.
Yeni,	Her zaman PD'yi temsil eder	İlerlemeyi tanımlamaz	Her zaman PD'yi temsil eder	İlerlemeyi tanımlamaz

Tablo 7. Katı tümörleri değerlendirmek için kılavuz ilkeler karşılaştırması				
	İki boyutlu değerlendirme		**Tek boyutlu değerlendirme**	
	WHO	**irRC**	**RECIST**	**irRC**
ölçülebilir olmayan				
Gösterge olmayan lezyonlar	Değişiklikler CR, PR, SD ve PD tanımlamasına katkıda bulunur	irCR'nin (tam yok oluş gerekir) tanımlanmasına katkıda bulunur	Değişiklikler CR, PR, SD ve PD tanımlamasına katkıda bulunur	irCR'nin (tam yok oluş gerekir) tanımlanmasına katkıda bulunur
CR	Bütün lezyonların yok olması*	Bütün lezyonların yok olması*	Bütün lezyonların yok olması*	Bütün lezyonların yok olması*
PR	Referansa göre bütün gösterge lezyonların SPD'sinde ≥%50 azalma*	Referansa göre tümör yükünde ≥%50 azalma*	Referansa göre ≥%30 azalma*	Referansa göre ≥%30 azalma*
SD	Referansa göre tümör yükünde <%50 azalma ve en düşük noktadan <%25 artış, yeni lezyon yok ve hedef olmayan	Referansa göre tümör yükünde <%50 azalma ve en düşük noktadan <%25 artış	Referansa göre tümör yükünde <%30 azalma ve en düşük noktadan <%20 artış, yeni lezyon yok ve hedef olmayan	Referansa göre tümör yükünde <%30 azalma ve en düşük noktadan <%20 artış

Tablo 7. Katı tümörleri değerlendirmek için kılavuz ilkeler karşılaştırması				
	İki boyutlu değerlendirme		**Tek boyutlu değerlendirme**	
	WHO	**irRC**	**RECIST**	**irRC**
	lezyonlarda ilerleme yok		lezyonlarda ilerleme yok	
PD	en düşük noktadan ≥%25* ve/veya hedef olmayan lezyonların büyüklüğünde herhangi bir artış ve/veya yeni lezyonlar (herhangi bir tek zaman noktasında)	en düşük noktadan ≥%25 artış*	en düşük noktadan ≥%20 artış* ve/veya hedef olmayan lezyonların büyüklüğünde herhangi bir artış ve/veya yeni lezyonlar (herhangi bir tek zaman noktasında)	en düşük noktadan ≥%20 artış*
*en az 4 hafta aralıkla 2 ardışık gözlemle teyit gereklidir				

WHO, RECIST ve irRC kılavuz ilkelerinin veya bu alanda uzman olanların bildiği ve bir tümörün tedaviye yanıtını gösteren başka kılavuz ilkelerin herhangi biri veya hepsi, burada sunulan kombinasyon tedavilerinin etkinliğini değerlendirmek için kullanılabilir. Burada sunulan kombinasyonların tümöre karşı aktivitelerini değerlendirmenin örnek usulleri aşağıda Bölüm G.3'te açıklanmaktadır.

b. Tümör Markörlerinin Varlığı

Kanda, idrarda veya vücut dokularında tömür markörlerinin varlağı ve derecesi de ölçülebilir ve yanıt değerlendirmesi için kullanılabilir. Bu alanda uzman olanlar bu markörlerin tümör tedavisine verilen yanıtla bağlantılı olduğunu bilirler. Markörün varlığı tümörü olmayan bir kontrol deneğiyle veya denekler popülasyonuyla veya tedaviden önce veya son dozdan veya terapi aralığından önce bir denekten alınan referans numunesiyle karşılaştırılabilir. Markörün bir kontrole veya normal numuneye göre daha yüksek seviyelerde ekspresyonu, bir tümörün varlığıyla ilişkilidir. Bir referans numunesine göre markörün seviyesindeki veya derecesindeki bir azalma tedaviye verilen yanıtı gösterebilir. Bazı örneklerde, örneğin, markör bir hücre içi markör olduğunda, periferal kanda markördeki bir artış tümör hücresi lizizini ve immünoterapinin terapötik etkinliğini gösterir. T hücresiyle tanımlanan tümörle ilişkili antijen peptit dizilerini içeren bir veri tabanı oluşturulmuştur (Vigneron ve diğerleri, (2013) Cancer Immun. 13:15; cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet gibi başka veri tabanlarına da bakınız). Örnek tümör markörleri ve ilişkili oldukları tümör tipleri aağıdaki Tablo 8'de verilmektedir:

Tablo 8. Örnek tümör markörleri ve ilişkili tümör tipleri

Tümör markörü	**İlişkili tümör tip(ler)i**
Alfa fetoprotein (AFP)	germ hücreli tümör, hepatoselüler karsinom
CA15-3	meme kanseri
CA27-29	meme kanseri
CA19-9	pankreas kanseri, ayrıca kolorektal kanser ve başka gastrointestinal kanser tipleri.
CA-125	Yumurtalık kanseri, ayrıca endometriyal kanser, fallop tüpü kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri ve gastrointestinal

Tablo 8. Örnek tümör markörleri ve ilişkili tümör tipleri	
Tümör markörü	**İlişkili tümör tip(ler)i**
	kanser.
Kalsitonin	medüler tiroit karsinomu
Kalretinin	mezotelyom, seks kord-gonadal stromal tümör, adrenokortikal karsinom, sinoviyal sarkom
Karsinoembriyonik antijen (CEA)	gastrointestinal kanser, rahim ağzı kanseri, akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, meme kanseri, idrar yolu kanseri
CD34	hemanjiyoperisitom/soliter fibröz tümör, pleomorfik lipom, gastrointestinal stromal tümör, dermatofibrosarkom protuberans
CD99	Ewing sarkomu, primitif nöroektodermal tümör, hemanjiyoperisitom/soliter fibröz tümör, sinoviyal sarkom, lenfoma, lösemi, seks kord-gonadal stromal tümör
CD117	gastrointestinal stromal tümör, mastositoz, seminom
Kromogranin	nöroendoktrin tümör
Kromozomlar 3, 7, 17 ve 9p21	mesane
Sitokeratin (çeşitli tipler)	Birçok karsinom tipi, bazı sarkom tipleri
Desmin	düz kas sarkomu, iskelet kası sarkomu, endometriyal stromal sarkom
Epitelyal membran antijeni (EMA)	birçok karsinom tipi, menenjiyom, bazı sarkom tipleri
Epitelyal tümör antijeni (ETA)	meme kanseri
Faktör VIII, CD31 FL1	vasküler sarkom
Gliyal fibriler asidik protein (GFAP)	gliyom (astrositom, ependimom)

Tablo 8. Örnek tümör markörleri ve ilişkili tümör tipleri	
Tümör markörü	**İlişkili tümör tip(ler)i**
Gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15)	meme kanseri, yumurtalık kanseri, tükürük bezi kanseri
HMB-45	melanom, PEComa (örneğin anjiyomiyolipom), berrak hücreli karsinom, adrenokortikal karsinom
Beşeri koryonik gonadotropin (hCG)	gestasyonel trofoblastik hastalık, germ hücreli tümör, koryokarsinom
İmmünoglobülin	lenfoma, lösemi
İnhibin	seks kord-gonadal stromal tümör, adrenokortikal karsinom, hemanjiyoblastom
Keratin (çeşitli tipler)	karsinom, bazı sarkom tipleri
Lenfosit markörü (çeşitli tipler)	lenfoma, lösemi
MART-1 (Melan-A)	melanom, steroit üretici tümörler (adrenokorkital karsinom, gonadal tümör
Melanomla ilişkili antijen (MAGE)	malin melanom
MUC-1	meme kanseri
Kasa spesifik aktin (MSA)	miyosarkom (leyomiyosarkom, rabdomiyosarkom)
Myo D1	rabdomiyosarkom, küçük, yuvarlak, mavi hücre tümörü
Nörofilament	nöroendokrin tümör, akciğerin küçük hücreli kasinomu,
Nörona spesifik enolaz (NSE)	nöroendokrin tümörü, akciğerin küçük hücreli karsinomu, meme kanseri
NY-ESO-1	melanom, yumurtalık kanseri, meme kanseri, mesane kanseri prostat kanseri hepatoselüler karsinom

Tablo 8. Örnek tümör markörleri ve ilişkili tümör tipleri	
Tümör markörü	**İlişkili tümör tip(ler)i**
Plasental alkalin fosfataz (PLAP)	seminom, disgerminoma, embriyonal karsinom
Prostata spesifik antijen	prostat
PTPRC (CD45)	lenfoma, lösemi, histiositik tümör
S100 proteini	melanom, sarkom (nörosarkom, lipom, kondrosarkom), astrositom, gastrointestinal stromal tümör, tükürük bezi kanseri, bazı adenokarsinom tipleri, histiositik tümör (dendritik hücre, makrofaj)
Düz kas aktini (SMA)	gastrointestinal stromal tümör, leyomiyosarkom, PEComa
Sinaptofisin	nöroendokrin tümör
Tiroglobülin	tirot kanserinin (ama medüller tiroit kanserinde değil) ameliyat sonrası markörü
Tiroit transkripsiyon faktörü-1	tiroit kanserinin bütün tipleri, akciğer kanseri
Tümör M2-PK	kolorektal kanser, meme kanseri, renal hücreli karsinom, akciğer kanseri, pankreas kanseri, yemek borusu kanseri, mide kanseri, rahim ağzı kanseri, yumurtalık kanseri
Tirozinaz	malin melanom
Vimentin	sarkom, renal hücreli karsinom, endometriyal kanser, akciğer karsinomu, lenfoma, lösemi, melanom

Bazı durumlarda, yukarıda açıklananlar gibi, terapötik etkinliği değerlendirmek için çeşitli kılavuz ilkelere göre, kombinasyondaki markör seviyeleri hedef olmayan tümörlerin büyüklükleriyle birlikte, yanıt kriterleri arasında hesaba katılır, CR bütün hedef olmayan tümörlerin yok olduğunu ve normal tümör markörü seviyelerini belirtir, eksik yanıt veya SD bir veya daha fazla hedef olmayan tümörün devam ettiğini ve/veya normal sınırların üzerindeki tümör markörü seviyelerini belirtir ve PD bir veya daha fazla yeni tümörün ortaya çıktığını ve/veya mevcut hedef olmayan tümörlerin ilerlediğini belirtir.

c. İmmünolojik İzleme

Burada sunulan kombinasyon terapisi, bağışıklık sistemi kontrol noktası protein aktivitesini inhibe etme etkisi yapar ve dolayısıyla bir bağışıklık yanıtının inhibisyonunu azaltır veya bir bağışıklık yanıtını arttırır, böylece burada sunulan kombinasyon terapisini alan hastada tümöre karşı bağışıklık gelişebilir. Bir denekte, örneğin hastada veya hayvan modellerinde bir bağışıklık yanıtını değerlendirmek üzere katı tümörlerde bağışıklık terapisini değerlendirmek için, bir kanser tedavisinin klinik etkinliğiyle bağlantılı olan çeşitli kriterler kullanılabilir (örneğin bakınız: Clay ve diğerleri, (2001) Clin Cancer Res. 7:1127-1135). İmmünolojik izleme sınırlandırıcı olmamak koşuluyla periferal kanda veya tümörlerde spesifik hücre tiplerinin, örneğin spesifik bağışıklık hücrelerinin sıklığının izlenmesini, bağışıklık hücreleri üzerinde spesifik markörlerin ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin izlenmesini, antikor ve CD4+ veya CD8+ T hücresi yanıtları da dâhil olmak üzere antijene spesifik bağışıklık yanıtlarının ölçülmesini ve spesifik bağışıklık hücresi popülasyonları tarafından üretilen sitokinlerin periferal seviyelerindeki değişikliklerin izlenmesini içerebilir.

(i) Periferal kanda spesifik hücre tiplerinin sıklığı

Periferal kanda veya dokularda, örneğin bir bağışıklık yanıtıyla ilişkili dokularda (örneğin dalak veya lenf düğümleri) veya tümörlerde spesifik bağışıklık hücresi tiplerinin sayımları, kanser tedavilerinin klinik etkinlikle bağlantısını belirlemek için kullanılabilir. Tedavi edilen hastaların veya hayvanların kanında spesifik hücre tiplerinin sıklığı, örneğin akış sitometrisi usulleri kullanılarak belirlenebilir. Hücre tipi sayılarını elde etmek için akış sitometrisi kullanıldığında, bir ikili platform yaklaşımı veya bir tek platform yaklaşımı kullanılabilir.

Bir ikili platform yaklaşımında, ilgilenilen hücreleri bir referans popülasyonunun bir yüzdesi olarak, örneğin CD4+ T lenfosit hücrelerini toplam lenfosit popülasyonunun bir yüzesi olarak belirlemek için bir akış sitometresi kullanılır. Mutlak akyuvar sayısı (WBC) ve lenfosit yüzdesi daha sonra bir hematoloji analizörü kullanılarak, standart prosedürlerle belirlenir. Dolayısıyla mutlak CD4+ T lenfosit sayısı, mutlak WBC, lefonist yüzdesi ve CD4+ T lenfosit yüzdesinin çarpımıdır. Morfoloji temelinde ilgilenilen hücreleri belirlemek için, ilgilenilen hücre popülasyonu örneğin öne saçılma ve yana saçılma sınırlamaları gibi ışık saçılma sınırlamaları kullanılarak belirlenebilir. Spesifik usullerde, kan numuneleri bir veya daha fazla immünolojik markörü tanıyan antikorlarla birlikte

inkübe edilebilir ve ilgilenilen popülasyonu belirlemek için tek boyutlu veya çok boyutlu geçitleme stratejileri kullanılabilir. Bu usuller bu alanda uzman olanlar için rutin usullerdir. Lenfositlerin spesifik popülasyonlarını ayırt etmek için kullanılabilen markörlerin sınırlandırıcı olmayan örnekleri Tablo 9'da verilmektedir.

Tablo 9. Lenfositler için tanıma markörleri	
Hücre Tipi	**Fenotipik Markör(ler**
NK hücreleri	CD16 CD56, ama CD3 değil
Yardımcı T hücreleri	TCRαβ, CD3 ve CD4
Sitotoksik T hücreleri	TCRαβ, CD3, CD8, CD107, IFN
γδ T hücreleri	TCRγδ ve CD3
B hücreleri	MHC sınıf II, CD19 ve CD21

Bir tek platform yaklaşımında, hücre sayısı, bir hematoloji analizörüne gerek olmadan akış sitometresinin kendisinden elde edilir. Bu usul için, tam bir bilinen numune hacmi, saptanacak immünolojik markör(ler)e yönelik ilişkili antikorlarla karıştırılır ve ilgilenilen hücre popülasyonunu doğru olarak saptamak için bir geçitleme stratejisi kullanılır. Daha sonra hücre popülasyonu bu alanda uzman olanların bildiği çeşitli usullerle yeniden hacimle ilişkilendirilebilir. Bunlar arasında mikroboncuk, volumetrik, mikroflorometrik ve akış hızı kalibrasyon usulleri yer alır.

İlgilenilen hücre popülasyonunun konsantrasyonunu belirlemenin en yaygın usulü mikroboncukların kullanılmasına dayanır. Örneğin bilinen bir konsantrasyonda süspansiyon haline getirilmiş bir numune ve mikroboncuklar (5-10 μm çapında) eşit hacimlerde karıştırılır. Hücre olguları sayısı ve boncuk olguları sayısı belirlenir ve mutlak hücre konsantrasyonu Mutlak Hücre Sayısı = Hücre olguları sayısı/Boncuk olguları sayısı x boncuk konsantrasyonu formülü kullanılarak belirlenir.

İmmünolojik izlemenin bazı örneklerinde, tedaviden önceki ve sunulan terapinin uygulamasından sonra bir veya daha fazla önceden belirlenmiş zamanda kan, dalak veya tümör kurutucu lenf düğümü dokuları veya tümör biyopsilerinden alınan numunelerde mutlak lenfosit sayısı (ALC) belirlenir. Mutlak lenfosit sayısı, birim hacim için periferal kandaki lenfositlerin sayısıdır. ALC, burada sunulan kombinasyon terapisinin uygulanmasından önce veya onunla aynı gün ve uygulamadan sonra çeşitli zamanlarda

periyodik olarak, örneğin bir uygulama döngüsünün önceki uygulamasından veya son uygulamasından sonra, örneğin uygulamadan sonra en azından veya en fazla veya her 1 günde, 2 günde, 3 günde, 4 günde, 5 günde, 6 günde, 7 günde, 2 haftada, 3 haftada, 4 haftada, 5 haftada, 6 haftada, 7 haftada, 8 haftada veya 12 haftada bir, örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinin uygulama döngüsünün önceki uygulamasından veya son uygulamasından sonra, örneğin uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün veya 7 gün sonra belirlenebilir. İmmünoterapik tedavinin öncesinde ve sırasında zaman içinde ALC'deki bir artış, bağışıklık hücrelerinin proliferasyonunda bir artışa işaret eder ve klinik yararla pozitif olarak bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Berman ve diğerleri, (2009) J Clin Oncol 27:15s, (suppl; abstr 3020)). Bazı örneklerde uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün, 7 gün, 2 hafta, 3 hafta, 4 hafta, 5 hafta, 6 hafta, 7 hafta, 8 hafta veya 12 hafta sonra, örneğin bir uygulama çevriminde önceki uygulamadan veya son uygulamadan sonra ALC, uygulamanın öncesindeki veya onunla aynı gündeki ALC'ye göre 1.1 kat, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 kat veya daha fazla artar ve terapötik etkiyle bağlantılıdır.

Başka örneklerde, doğal öldürücü (NK) hücreler (CD16 ve CD56 markörlerini eksprese eder, ama CD3 markörlerini etmez), Yardımcı T Hücreleri (TCRαβ, CD3 ve CD4 markörlerini eksprese eder), sitotoksik T hücreleri (veya efektör T hücreleri; TCRαβ, CD3 ve CD8 markörlerini veya CD8, CD107 ve IFN markörlerini eksprese eder) veya B hücrelerinin (MHC sınıf II, CD19 ve CD21 markörlerini eksprese eder) mutlak sayıları, burada sunulan kombinasyon terapisinin uygulanmasına verilen yanıtta immünolojik aktiviteyi ölçmenin bir usulü olarak belirlenebilir, burada bu lenfosit popülasyonlarının birindeki veya daha fazlasındaki bir artış bağışıklık aktivitesindeki bir artışa işaret eder. Doğal öldürücü (NK) hücreler, Yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücreleri (veya efektör T hücreleri) ve/veya B hücrelerinin sayıları, burada sunulan immünomodülatör kombinasyon terapisinin uygulanmasından önce veya onunla aynı gün ve uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün, 7 gün, 2 hafta, 3 hafta, 4 hafta, 5 hafta, 6 hafta, 7 hafta, 8 hafta veya 12 hafta sonra, örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinin uygulama döngüsünün önceki uygulamasından veya son uygulamasından sonra, örneğin uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün veya 7 gün sonra belirlenebilir. İmmünoterapötik tedavinin öncesinde ve sırasında zaman içinde doğal öldürücü (NK) hücreler, Yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücreleri (veya efektör T hücreleri) ve/veya B hücrelerinin sayılarındaki bir artış, bağışıklık hücrelerinin proliferasyonunda bir artışa

işaret eder ve klinik yararla pozitif olarak bağlantılı olabilir. Bazı örneklerde uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün, 7 gün, 2 hafta, 3 hafta, 4 hafta, 5 hafta, 6 hafta, 7 hafta, 8 hafta veya 12 hafta sonra, örneğin bir uygulama döngüsünde önceki uygulamadan veya son uygulamadan sonra doğal öldürücü (NK) hücreler, Yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücreleri (veya efektör T hücreleri) ve/veya B hücrelerinin sayıları, uygulamanın öncesindeki veya onunla aynı gündeki doğal öldürücü (NK) hücreler, Yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücreleri (veya efektör T hücreleri) ve/veya B hücrelerinin sayılarına göre 1.1 kat, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 kat veya daha fazla artar ve terapötik etkiyle bağlantılıdır.

T_{reg} hücreleri gibi baskılayıcı hücre tiplerinin nispi sayılarının değerlendirilmesi akış sitometrisiyle, örneğin CD25, Foxp2 ve CD4 pozitifliği için geçitlemeyle de ölçülebilir. T_{rg} hücrelerinin sayılarını belirlemek için numuneler örneğin dalak, len düğümleri, örneğin tümör kurutucu lenf düğümleri veya kandan alınabilir. T_{reg} hücrelerinin sayısındaki bir artış kötü klinik sonuçla ilişkilendirilmiştir (bakınız: Callahan ve diğerleri, (2010) Semin Oncol. 37(5):473-484). T_{reg} hücreleri gibi baskılayıcı bağışıklık hücresi tiplerinin sayıları, burada sunulan kombinasyon terapisinin uygulanmasından önce ve uygulanmasından sonraki farklı zaman noktalarında ölçülebilir. Örneğin T_{reg} hücreleri gibi baskılayıcı bağışıklık hücresi tiplerinin sayıları, burada sunulan immünomodülatör kombinasyon terapisinin uygulanmasından önce veya onunla aynı gün ve uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün, 7 gün, 2 hafta, 3 hafta, 4 hafta, 5 hafta, 6 hafta, 7 hafta, 8 hafta veya 12 hafta sonra, örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinin uygulama döngüsünün önceki uygulamasından veya son uygulamasından sonra, örneğin uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün veya 7 gün sonra belirlenebilir. Bazı örneklerde, sunulan kombinasyon terapisinin maksimum terapötik dozu, bir hastada veya hayvan modelinde, uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün veya 7 gün sonra, örneğin bir uygulama döngüsünün önceki uygulamasından veya son uygulamasından sonra, uygulamadan önceki T_{reg} hücreleri seviyesiyle karşılaştırıldığında T_{reg} hücreleri gibi baskılayıcı bağışıklık sistemi hücre tiplerinin sayısında bir artışa yol açmayan maksimum doz olarak belirlenebilir, burada T_{reg} hücreleri gibi baskılayıcı bağışıklık sistemi hücre tipleri sayısındaki bir artış, burada sunulan kombinasyon terapisinin uygulanmasından önce veya onunla aynı gün bu hücrelerin sayısıyla karşılaştırıldığında ölçülen zaman noktasında T_{reg} hücreleri gibi baskılayıcı bağışıklık

sistemi hücre tiplerinin sayısında 1.1 kat, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 kat veya daha fazla bir artış olarak belirlenir.

Bazı örneklerde, sunulan kombinasyon terapisinin uygulanması, efektör ve/veya baskılayıcı hücre sayısının mutlak miktarında ve/veya bu alt kümelerin oranında bir değişikliğe yol açabilir. Bazı örneklerde, tümöre karşı etkideki bir artış, efektör hücrelerin baskılayıcı hücrelerin sayısına oranında bir artışla bağlantılı olup, burada ölçülen zaman noktasında efektör hücrelerin baskılayıcı hücrelere oranı, sunulan kombinasyon terapisinin uygulanmasından önceki veya onunla aynı gündeki orandan 1.1 kat, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 kat fazla veya daha fazladır.

(ii) Bağışıklık hücresi markörlerinin saptanması

Bazı örneklerde, bağışıklık hücreleri üzerindeki spesifik markörlerin saptanması, kanser tedavilerinin terapötik etkinlikle bağlantısını belirlemek için kullanılabilir. Bu markörler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla uyarılabilir kostimülatör (ICOS), HLA-DR (beşeri MHC II) ve CD45RO yer alır.

Bazı örneklerde, ICOS, burada sunulan kombinasyon terapisinin terapötik etkinliğini izlemek için T hücrelerinin yüzeyinde saptanır. ICOS Ig gen familyasının bir üyesidir ve aktivasyonun ardından CD4+ ve CD8+ T hücreleri üzerinde eksprese olur. Yüksek seviyelerde ICOS eksprese eden CD4+ hücrelerinin sıklığındaki bir artış, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve terapötik etkinlikle bağlantılıdır.

HDLA-DR T hücreleri üzerinde eksprese olur ve aktivasyondan sonra geç zaman noktalarında artar ve CD45RO bellek T hücrelerinin belirlenmiş bir markörüdür. HDLA-DR ve/veya CD45RO eksprese eden bağışıklık hücrelerinin sayılarındaki artışlar da burada sunulan kombinasyon terapilerinin etkinliğini izlemek için kullanılabilir.

Bağışıklık hücresi markörlerinin saptanması için numuneler periferal kandan veya bir bağışıklık yanıtıyla ilişkili dokular gibi dokulardan (örneğin dalak veya lenf düğümleri), burada sunulan kombinasyon terapisinin uygulanmasından önce veya uygulamayla aynı gün ve/veya uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün, 7 gün, 2 hafta, 3 hafta, 4 hafta, 5 hafta, 6 hafta, 7 hafta, 8 hafta veya 12 hafta sonra, örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinin bir uygulama döngüsünün önceki uygulamasından veya son uygulamasından sonra, örneğin uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün veya 7 gün sonra alınabilir. Markörler örneğin akış sitometrisi usulleri, immünofloresans ve/veya

Western blot kullanılarak belirlenebilir. Bu usuller bu alanda iyi bilinmekte ve burada açıklanmaktadır.

(iii) Antijene spesifik bağışıklık yanıtları

Bazı örneklerde, burada sunulan kombinasyon terapisinin terapötik etkinliğini değerlendirmek için antijene spesifik bağışıklık yanıtları kullanılabilir. Tümörü olan bir hastada bir bağışıklık yanıtı oluştuğunda, hastada tipik olarak tümöre spesifik veya tümörle ilişkili antijenleri (TAA'lar), örneğin tümör antijenine spesifik T hücrelerini tanıyan bağışıklık hücrelerinin seviyeleri artar. Dolayısıyla örneğin bir immünoterapötik tedavinin ardından, majör histokompatibilite kompleksleri (MHC) (örneğin MHC sınıf I veya sınıf II kompleksleri) çerçevesinde TAA'lar gibi bir veya daha fazla tümörle ilişkili antijeni spesifik olarak bağlayan tümöre spesifik T hücrelerinin, örneğin sitotoksit T lenfositlerin (CTL'ler) veya CD4 T hücrelerinin sayısındaki bir artış, tedavinin sonucu olarak tümöre karşı yanıttaki bir artışı gösterir. Dolayısıyla, tümörle ilişkili antijen(ler)in kullanıldığı bağlanma tahlilleri ve toplanan dolaşan veya tümörde lokalize olmuş bağışıklık hücreleri, konakçıda bir immünoterapiye yanıt olarak tümörle ilişkili antijen(ler)e yönelik yanıtın artıp artmadığını belirlemek için kullanılabilir. Örneğin spesifik kanser tipleri için tümörle ilişkili antijenler bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir veya ampirik olarak belirlenebilir. Sınırlandırıcı olmayan örnek tümör antijenleri ve bunlarla ilişkili kanserler yukarıda Tablo 8'de, G.3.b bölümünde sayılmaktadır.

Burada sunulan bir kombinasyon terapisinin uygulanmasıyla bağışıklık yanıtının desteklenmesi, spesifik olarak tümörle ilişkili antijen(ler)e bağlanan dolaşımdaki veya tümördeki bağışıklık hücrelerinin sayısındaki bir artışın gösterdiği üzere, bir veya daha fazla tümörle ilişkili antijene yönelik bir bağışıklık yanıtı üretebilir veya arttırabilir. Dolayısıyla, burada sunulan bir kombinasyon terapisinin uygulanmasının ardından tümör antijenine spesifik bir bağışıklık yanıtının veya bu yanıttaki bir artışın saptanması terapötik etkinliğin göstergesidir.

Tümör antijenine spesifik bir bağışıklık yanıtı örneğin *ex vivo,* bir MHC tetramer tahlili, enzie bağlı immünospot (ELISPOT) tahlili, T hücresi stimülasyon tahlili ve/veya ELISA kullanılarak ölçülebilir. Bu usuller bu alanda uzman olanlar tarafından iyi bilinmektedir (örneğin bakınız: James ve diğerleri, (2009) J Vis Exp. (25): 1167, Lycke ve diğerleri, (2001) Curr Protoc Immunol. Chapter 7:Unit 7.14; Kruisbeek ve diğerleri, (2004) Curr Protoc Immunol. Chapter 3:Unit 3.12 ve burada). Tümörü olan hastalardan veya hayvan

modellerinden periferal kan numuneleri burada sunulan kombinasyon terapisinin uygulanmasından önce veya uygulamayla aynı gün ve sunulan terapinin uygulanmasınının ardından herhangi bir veya daha fazla önceden belirlenmiş zaman noktasında, örneğin uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün, 7 gün, 2 hafta, 3 hafta, 4 hafta, 5 hafta, 6 hafta, 7 hafta, 8 hafta veya 12 hafta sonra, örneğin burada sunulan kombinasyon terapisinin bir uygulama döngüsünün önceki uygulamasından veya son uygulamasından sonra, örneğin uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün veya 7 gün sonra alınabilir. Daha sonra kan numuneleri fraksiyonlarına ayrılır ve bir bağışıklık yanıtının oluşumunu değerlendirmek için bir MHC tetramer tahlili, enzime bağlı immünospot (ELISPOT) tahlili, T hücresi stimülasyon tahlili ve/veya ELISA'nın biri veya daha fazlası kullanılarak analiz edilir. Tedavi sonrası ölçülen yanıt, referans numunesiyle, tedaviden önce veya tedavi günü ölçülen yanıtla karşılaştırıldığında 1.1 kat, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 kat veya daha fazla arttığında antijene spesifik bir bağışıklık yanıtı etkili kabul edilir. Sunulan kombinasyon terapisinin uygulanmasının ardından tümör antijenine spesifik bağışıklık yanıtının oluşması terapötik etkinliğin göstergesidir.

4. Farmakokinetik ve Farmakodinamik tahliller

Farmakokinetik ve tolerabilite çalışmaları hayvan modelleri kullanılarak yapılabilir veya burada sunulan kombinasyonların ve bileşimlerin etkisini değerlendirmek için hastalarla kilinik çalışmalar sırasında yapılabilir. Hayvan modelleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla fareler, sıçanlar, tavşanlar, köpekler, kobaylar ve insan dışı primat modelleri, örneğin sinomolgus maymunları veya Hint şebekleri yer alır. Bazı durumlarda, farmakokinetik ve tolerabilite çalışmaları sağlıklı hayvanlar kullanılarak yapılır. Başka örneklerde, çalışmalar buradaki bir kombinasyonla veya bileşimle tedavinin düşünüldüğü bir hastalığın hayvan modelleri, örneğin kanserin hayvan modelleri kullanılarak yapılır.

Burada sunulan kombinasyonların veya bileşmilerin farmakokinetik özellikleri, uygulamanın ardından maksimum (pik) immünoterapötik madde (veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzim) konsantrasyonu (C_{max}), pik zamanı (yani maksimum immünoterapötik madde konsantrasyonunun oluştuğu zaman; T_{max}), minimum immünoterapötik madde veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzim konsantrasyonu (yani immünoterapötik madde dozları arasındaki minimum konsantrasyon; C_{min}), eliminasyon yarılanma ömrü ($T_{1/2}$) ve eğri altındaki alan (yani zaman konsantrasyona karşı çizilerek oluşturulan eğri altındaki alan;

AUC) gibi parametreler ölçülerek belirlenebilir. Tipik olarak, burada sunulan kombinasyon terapisinin etken maddelerini içeren bileşimler sistemik olarak, örneğin tipik olarak intravenöz yolla uygulanır. İmmünoterapötik maddenin veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin subkütanöz yolla uygulandığı durumlarda, maddenin veya enzimin mutlak biyoyararlanımı, subkütanöz tatbikin ardından immünoterapötik maddenin veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin eğri altındaki alanı (AUC_{sc}) intravenöz tatbikin ardından immünoterapötik maddenin veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin AUC'siyle (AUC_{iv}) karşılaştırılarak belirlenir. Mutlak biyoyararlanım (F), $F = ([AUC]_{sc} \times doz_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times doz_{iv})$ formülüyle hesaplanabilir. Subkütanöz uygulamanın ardından plazmadaki immünoterapötik madde veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzim konsantrasyonu, bir immünoterapötik maddenin veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin kan numunelerindeki konsantrasyonlarını değerlendirmek için uygun olan, bu alanda bilinen herhangi bir usul kullanılarak ölçülebilir.

Birlikte uygulanan bir terapinin (örneğin immünoterapötik madde ve bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim) artan veya azalan konsantrasyonlarının etkisini değerlendirmek için farmakokinetik çalışmalarda bir dizi doz ve farklı doz uygulama sıklıkları uygulanabilir. Uygulanan terapötik maddelerin biyoyararlanım gibi farmakokinetik özellikleri, diğer madde, yani polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve/veya bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü birlikte uygulanarak veya uygulanmadan da değerlendirilebilir. Örneğin beagle'lar gibi köpeklere polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle kombinasyon halinde, örneğin polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin uygulanmasından sonra bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü uygulanabilir veya bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü veya polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, bir veya daha fazla uygulama yolu kullanılarak tek başına uygulanabilir. Bu çalışmalar, anti-hiyalüronan bir maddeyle, örneğin bir hiyalüronidazla birlikte uygulamanın bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün biyoyararlanım gibi farmakokinetik özellikleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapılabilir.

Güvenliği ve tolerabiliteyi değerlendirmek için çalışmalar da bu alanda bilinmektedir ve burada kullanılabilir. Buradaki kombinasyonun ve bileşimlerin uygulanmasının ardından olumsuz reaksiyonların ortaya çıkışı izlenebilir. Olumsuz reaksiyonlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla ödem veya şişme gibi enjeksiyon yeri reaksiyonları, baş ağrısı, ateş, yorgunluk, ürperme, kızarma, sersemlik, ürtiker, hırıltılı solunum ve göğüste

sıkışma, bulantı, kusma, titreme, sırt ağrısı, göğüs ağrısı, kas krampları, nöbetler veya konvülsiyonlar, kan basıncında değişiklikler ve anafilaktik veya şiddetli aşırı duyarlılık yanıtları yer alabilir.

Bağışıklıkla ilişkili olumsuz olayların (irAE'ler) ortaya çıkması da izlenebilir. irAE'ler arasında kızarıklıklar yer alır, ama nadir durumlarda yaşamı tehdit eden toksik epidermal nekrolize ve hafif ila orta şiddette, ama zaman zaman şiddetli ve inatçı diyareyle özellik kazanan kolite ilerleyebilir. Bazı örneklerde, immünoterapiye yanıt olarak hipofizit, hepatit, pankreatit, iridosiklit, lenfadenopati, nöropatiler de oluşabilir. Yan etkiler arasında kas-iskelet yan etkileri de yer alabilir (bakınız: ABD Yayını No. 2012/0020951). Tipik olarak, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorun (örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru) ve/veya anti-hiyalüronan maddenin, örneğin polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin artan veya azalan konsantrasyonlarının gözlemlenen yan etkilerin herhangi biri üzerindeki etkisini değerlendirmek için güvenlik ve tolerabilite çalışmalarında çeşitli dozlar ve farklı doz uygulama sıklıkları uygulanabilir.

G. Kombinasyon Terapisi Usulleri ve Kullanımları

Burada sunulan kombinasyonlar ve bileşimler kanserleri ve özellikle en az orta ila yüksek HA fenotipine sahip katı tümörlerle özellik kazanan kanserleri tedavi etmek için terapi usullerinde kullanılabilir. Usullerde, polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, yani bir hiyalüronidaz, örneğin PEGPH20 gibi bir PH20 ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, yani bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorun (örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru) bir kombinasyon terapisi, en azından orta ila yüksek HA seviyelerine sahip olmakla özellik kazanan bir katı tümörü olan bir hastaya uygulanır. Bazı örneklerde, burada sunulan kombinasyon terapilerine başka bir antineoplastik madde veya terapi, örneğin bir kemoterapötik madde, radyoterapi veya ameliyat dâhil edilebilir.

Burada polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle bir kombinasyon rejiminde uygulandığında bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitör maddesinin, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorun (örneğin anti-CTLA4 veya anti-PD-1) tümöre karşı etkilerinin, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor tek başına uygulandığında elde edilen etkileri çok aştığı tespit edildi. Özellikle bu sonuçlar polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim

(örneğin PEGPH20 gibi polimere konjuge edilmiş çözünür hiyalüronidaz) bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün uygulanmasından önce ve genellikle en fazla 48 saat (örneğin 24 saat) önce uygulandığında ortaya çıkmaktadır. Örneğin etkiler sinerjistik veya aditif olabilir. Burada sunulan kombinasyon terapisinde gözlemlenen tümöre karşı aktivite, şimdiye kadar var olan immünoterapilerle elde edilmeyen sonuçlara ulaşmaktadır.

1. Kanserler

Kanserli hücreler, neoplazmalar, tümörler ve metastazların tedavisi için bir anti hiyalüronan madde, örneğin polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini bloke ederek bağışıklık yanıtını arttıran bir maddenin (yani bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü), örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorun (örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru) kombinasyon terapisi kullanılabilir. Burada sunulan kombinasyon terapisi konakçının bağışıklık yanıtını aktive eder, böylece tümör büyümesinin yavaşlaması veya azalması, tümör hacminde bir azalma ve bazı durumlarda tümörün eliminasyonu veya kökünün kazınmasıyla sonuçlanan tümöre karşı ekinlik gösterir. Pankreas kanseri gibi yüksek bir HA içeriğiyle özellik kazanan kanserler için, tek başına bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir maddenin uygulanmasıyla karşılaştırıldığında kombinasyon terapisi önemli yararlar sağlamaktadır.

Örneğin kombinasyon terapisi akciğer ve nefes borusu, meme, kolon ve rektum, böbrek, mide, yemek borusu, karaciğer ve intrahepatik safra kanalı, mesane, beyin ve başka sinir sistemi, baş ve boyun, ağız boşluğu ve gırtlak, rahim ağzı, rahim, tiroit, yumurtalık, testis, prostat tümörleri, malin melanom, kolanjiokarsinom, timom, melanom dışı cilt kanserlerinin yanı sıra hematolojik tümörler ve/veya habasetler, örneğin çocukluk çağı lösemisi ve lenfomaları, multipl miyelom, Hodgkin hastalığı, lenfositik ve kütanöz kökenli lenfomalar, akut ve kronik lösemi, örneğin akut lenfoblastik, akut miyelositik veya kronik miyelositik lösemi, plazma hücreli neoplazma, lenfoit neoplazma ve AIDS'le ilişkili kanserler gibi orta ila yüksek HA içeriğiyle özellik kazanan herhangi bir tümörü tedavi etmek için kullanılabilir, burada tümör orta ila yüksek HA içeriğine sahiptir. Tipik olarak kombinasyon terapisi, orta HA (HA^{orta} veya HA^{+2}) ila yüksek HA ($HA^{yüksek}$ veya HA^{+3}) içeriğine sahip katı tümörlerin, örneğin katı tümör $HA^{yüksek}$ stromal kanserlerin tedavisi için kullanılır. Örnek $HA^{yüksek}$ tümörler arasında örneğin pankreas tümörleri, yumurtalık

tümörleri, akciğer tümörleri, kolon tümörleri, prostat tümörleri, rahim ağzı tümörleri ve meme tümörleri yer alır.

Özellikle, sunulan kombinasyon terapisiyle hedeflenen hiyalüronan açısından zengin kanserler, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim gibi bir anti-hiyalüronan maddeyle hedefleme için uygundur. Çeşitli hiyalüronan açısından zengin kanserler tanımlanmıştır. Hiyalüronan açısından zengin tümörler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla prostat, meme, kolon, yumurtalık, mide, baş ve boyun ve başka tümörler ve kanserler yer alır. Bazı durumlarda, hiyalüronan seviyeleri kötü prognozla, örneğin azalan hayatta kalım oranıyla ve/veya nüks olmadan hayatta kalım oranıyla, metastazlar, anjiyogenez, kanser hücresinin başka dokulara/alanlara yayılması ve kötü prognozun başka göstergeleriyle bağlantılıdır. Bu bağlantı örneğin, yumurtalık kanseri, SCC, ISC, prostat kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri de (NSCLC) dâhil olmak üzere akciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri ve pankreas kanseri de dâhil olmak üzere hiyalüronan açısından zengin tümörlerde gözlemlenmiştir (örneğin bakınız: Anttila ve diğerleri, (2000) Cancer Research, 60:150-155; Karvinen ve diğerleri, (2003) British Journal of Dermatology, 148:86-94; Lipponen ve diğerleri, (2001) Eur. Journal of Cancer, 849-856; Pirinen ve diğerleri, (2001) Int. J. Cancer: 95: 12-17; Auvinen ve diğerleri, (2000) American Journal of Pathology, 156(2):529-536; Ropponen ve diğerleri, (1998) Cancer Research, 58: 342-347). Dolayısıyla, hiyalüronan açısından zengin kanserler, kanserin bir veya daha fazla semptomunu tedavi etmek için bir hiyalüronidaz gibi bir anti-hiyalüronan maddenin uygulanmasıyla tedavi edilebilir.

Burada sunulan kombinasyon terapilerinde, bağışıklık sistemini aktive eden terapötik maddelerle desteklenen bağışıklık sistemi bazlı tümöre karşı aktiviteleri güçlendirmek için hiyalüronidazlar da dâhil olmak üzere hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler gibi anti-hiyalüronan maddeler kullanılabilir. Örneğin, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikorlar gibi bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin tümör yerine erişimini kolaylaştırarak, bağışıklık sistemi hücrelerinin infiltrasyonunu kolaylaştırarak ve/veya sitotoksik bağışıklık sistemi hücreleri ile hedef tümör hücreleri arasındaki yüzey temasını arttırarak bir konakçının tümöre karşı bağışıklık yanıtını güçlendirebilir. Örneğin rHuPH20 gibi hiyalüronidazlar da dâhil olmak üzere hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler, bir hastaya, tümör yeri civarına difüzyonu arttırmak (örneğin immünoterapötik maddelerin ve/veya bağışıklık sistemi hücrelerinin tümör yerinin içinde ve çevresinde dolaşımını ve/veya konsantrasyonlarını arttırmak), hiyalüronik

asit ayrışmasıyla olduğu gibi tümör hücresi hareketliliğini inhibe etmek ve/veya tümör hücresi apoptoz eşiğini düşürmek için etkili bir miktarda uygulanabilir. Bu, tümör hücresini/hücrelerini, tümör hücresini lenfositik lizize ve/veya ek terapötik maddeler de dâhil olmak üzere terapötik maddelerin etkisine daha duyarlı hale getiren bir anoikis durumuna getirebilir.

Bazı örneklerde, uygulanan hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, tümör yeri çevresine ve içine difüzyonu arttırarak (örneğin dolaşımı kolaylaştırarak) terapötik maddelerin (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörleri) tümörlere tatbikini arttırır (ABD Patenti No. 7,767,429, 8,202,517, ABD Yayını No. 2010-0003238). Dolayısıyla PH20 gibi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, bir hastaya, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle kombinasyon halinde (örneğin ondan sonra) uygulanan bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor gibi bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün tümörde bulunan lenfositler gibi bağışıklık sistemi hücrelerini aktive edebildiği tümör yerine erişimini arttırmak üzere, tümör yeri çevresine difüzyonu arttırmak için etkili bir miktarda uygulanabilir.

Başka örneklerde, tümör yeri çevresinde ve içinde dolaşımdaki hiyalüronan ayrıştırıcı enzim dolayımlı artışlar, tümörü infiltre eden lenfositler (TIL'ler) gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin tümör içine infiltrasyonunu kolaylaştırabilir (Singh ve diğerleri, (2012) Clin Cancer Res. 18:B6; Singh ve diğerleri, (2013) Cancer Res. 73(8 Ek):4999). Dolayısıyla, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle birlikte ve genellikle hiyalüronan ayrıştırıcı enzimden sonra uygulandığında, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinini inhibe eden madde(ler), tümöre karşı bir bağışıklık yanıtı oluşturmak üzere, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim tarafından hiyalüronanın ayrıştırılmasının ardından tümöre infiltre olan bağışıklık sistemi hücrelerini aktive edebilir.

Başka örneklerde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimler tarafından hiyalüronan ayrıştırılması, bağışıklık sistemi hücreleri ile hedef tümör hücreleri arasındaki yüzey temasını arttırarak kanser hücrelerinin lenfositik sitotoksik lizizini kolaylaştırabilir (McBride ve Bard (1979) J Exp Med. 149(2):507-515). Bu aktivite burada sunulan bir kombinasyon terapisinin uygulanmasının bir sonucu olarak tümöre karşı bir yanıtı daha da destekler.

2. Tedavi için Deneklerin Seçilmesi

Kanseri tedavi etmek için brada sunulan bir kombinasyon terapisini uygulama usulleri, orta ila yüksek HA içeriğiyle özellik kazanan bir tümörün veya kanserin tedavisi için hastaların

seçilmesi aşamalarını içerir. Bu usuller arasında bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim gibi bir anti-hiyalüronan madde ve bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor gibi bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün birlikte uygulanmasına dayanan tedaviye yanıt erme ihtimali olan, orta ila yüksek HA içeriğiyle özellik kazanan tümörleri olan hastaları belirlemek için potansiyel hastaların tümörlerindeki HA seviyelerini saptamaya yönelik usuller yer alır. Bir denekten alınan herhangi bir numune veya doku test edilebilir ve normal bir numune veya dokuyla karşılaştırılabilir. Hiyalüronan seviyeleri herhangi bir kaynaktan, örneğin bir dokudan (örneğin biyopsiyle alınmış), tümör, hücreler veya kan, serum, idrar veya başka vücut sıvılarından ölçülebilir. Numune seçimi bu alanda uzman olanların becerileri dâhilindedir.

Başka örneklerde, tedavi için seçilen hastalar var olan bir yükselmiş bağışıklık yanıtının markörlerini gösterir. Bazı örneklerde yükselmiş bağışıklık yanıtını mutlak lenfosit sayısındaki (ALC) bir artış gösterir.

a. Tümörlerin hiyalüronan içeriğinin ölçülmesi

Bir numunedeki hiyalüronan seviyelerinin değerlendirilmesi, ölçülmesi, belirlenmesi ve/veya saptanması bu alanda uzman olanların becerileri dâhilindedir. Hiyalüronan içeriği örneğin potansiyel bir hastadan alınan bir doku, hücre veya sıvı numunesinde ölçülebilir. Spesifik örneklerde, hiyalüronan içeriği tümör dokularında, örneğni tümör biyopsilerinde ölçülür. Örneğin bu usuller arasında immünohistokimya veya immünofloresansla immünolojik boyama veya katı faz bağlanma tahlilleri yer alır.

Denekleri hiyalüronan birikim derecesine (örneğin orta ila yüksek) göre seçme usulleri bu alanda bilinmektedir (örneğin bakınız: ABD Patent Yayını No. 2013/0202583; Jiang ve diğerleri (2012) Anticancer Res., 32:1203-1212; Kultti ve diğerleri (2012) Cancers, 4:873-903; ve Jacobetz ve diğerleri (2012) Gut, 62:112-120). Bu usullerde, hiyalüronanı saptamak için bir hiyalüronan bağlama proteini (HABP) kullanılabilir.

Başka bir örnekte, *in vitro* tümör hücrelerindeki hiyalüronan ekspresyonu ve üretimi, hiyalüronan sentaz üretimi (örneğin HAS1, HAS2 veya HAS3) değerlendirilerek belirlenebilir ve/veya *in vitro, ex vivo* veya *in vivo* hücreler tarafından ekspresyon da örneğin ELISA, SDS-PAGE, Western Blot, RT-PCR, immünohistokimya, histoloji veya akış sitometrisiyle tahlil edilebilir

Tahliller arasında *in vitro* veya *in vivo* tahliller yer alır. Bir numunede hiyalüronan ekspresyonunu ve seviyelerini değerlendirmek, belirlemek, ölçmek ve/veya başka türlü spesifik olarak saptamak için kullanılabilen örnek bağlanma tahlilleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla katı faz bağlanma tahlilleri (örneğin enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA)), radyoimmün tahlil (RIA), immünoradyometrik tahlil, floresans tahlili, kemilüminesan tahlil, biyolüminesan tahlil, western blot ve histokimya usulleri, örneğin antikor olmayan bir bağlayıcı maddenin kullanıldığı immünohistokimya (IHC) veya psödo immünohistokimya yer alır. ELISA usulleri gibi katı faz bağlanma tahlili usullerinde, örneğin tahlil bir sandviç formatında veya bir rekabetçi inhibisyon formatında olabilir. Başka örneklerde in vivo görüntüleme usulleri kullanılabilir.

Spesifik değişikliğin, örneğin HA'daki artışın veya azalmanın kullanılan tahlile bağlı olduğu takdir edilecektir. Örneğin, bir ELISA'da, belirli bir dalga uzunluğunda absorbanstaki veya protein miktarındaki kat olarak artış veya azalma (örneğin bir standart eğri kullanılarak belirlenir) bir kontrole göre ifade edilebilir. RT-PCR gibi bir PCR tahlilinde, değişiklik standartların kullanılması gibi, bu alanda uzman olanların bildiği usuller kullanılarak kontrol ekspresyon seviyeleriyle karşılaştırılabilir (örneğin kat olarak artış şeklinde ifade edilir).

Örneğin, bir hastadan alınan bir numunedeki hiyalüronan miktarı test edilirken, markörün saptanması, hastadan alınan numunedeki (örneğin kanserli hücre, doku veya sıvı) HA miktarının bir kontrol numunesine, örneğin önceki paragrafta açıklanan gibi bir kontrol numunesine kıyasla artmış olduğunun belirlenmesi olabilir. Bir örnekte, doku, hücre veya sıvıdaki HA miktarı kontrol numunesine kıyasla 0.5 kat, 1 kat, 2 kat, 3 kat, 4 kat, 5 kat, 6 kat, 7 kat, 8 kat, 9 kat, 10 kat, 11 kat, 12 kat, 13 kat, 14 kat, 15 kat, 20 kat veya daha fazla veya yaklaşık bu kadar artmışsa kanserin hiyalüronan açısından zengin bir kanser olduğu belirlenir. Örneğin HA içeriği yüksek tümörler genellikle bir kontrol numunesine (örneğin tümör) göre en az 2 kat veya daha fazla artmış HA gösterir. Kontrol numunesi, HA'yı sindirmek için bir hiyalüronidazla tedavi edilen numune olabilir ve boyanma spesifitesini teyit eder. Başka durumlarda, kontrol numunesi sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, bilinen veya nispi bir HA miktarına sahip bir sıvı, doku, ekstrakt (örneğin hücre veya çekirdek ekstraktı), nükleik asit veya peptit terkibi, hücre hattı, biyopsi, standart veya başka numuneyi, örneğin düşük seviyelerde HA eksprese ettiği bilinen bir tümör hattı, örneğin hüşük seviyelerde HA eksprese eden burad aaçıklanan örnek tümör hücre hatları, örneğin HCT 116 hücre hattı, HT29 hücre hattı, NCI H460 hücre hattı, DU145 hücre hattı, Capan-1

hücre hattı ve bu hücre hatları kullanılarak oluşturulan tümör modellerinden tümörler gibi bir numuneyi içerebilir.

i. Hiyalüronan Bağlayıcı Proteinler (HABP)

Denekler bir HABP'nin (hiyaladherinler olarak da geçer) bir numuneye bağlanması saptanarak seçilebilir. HABP büyükbaş hayvan burun kıkırdağından bir hiyalüronik asit bağlayıcı protein (örneğin EMD Millipore, Billerica, MA'dan Kat. No. 385911 olarak ticari olarak elde edilebilen HABP) olabilir. HABP bir bağlantı modülü veya hiyalüronana bağlandığı bilinen sahalar olan G1 sahaları içeren herhangi bir protein veya bunların iki veya daha fazla bu tür saha içeren multimerleri de olabilir. Bu proteinler bilinmekte ve ABD Patent Yayını No. 2013/0202583'te açıklanmaktadır. Böyle bir proteinin bir örneği TSG-6 veya TSG-6 bağlantı modülü (TSG-6-LM) veya bunların heparine daha az bağlanma gösteren varyantları veya bunların multimerleridir. Saptama için, HAPB saptanabilir bir şekilde işaretlenebilir. Örneğin HABP biyotinlenebilir.

Spesifik örneklerde, HABP ABD Patent Yayını No. 2013/0202583'te açıklandığı gibi bir multimerdir. Bir HABP multimeri her biri HA'ya bağlanabilen en az iki HA bağlanma yeri veya sahası (örneğin en az iki bağlantı modülü) içeren bir bağlama molekülüdür. Dolayısıyla, bir multimer tipik olarak, ayrılma sabiti (Kd) olarak ifade edildiğinde, genellikle 1 x 10^{-8} M ila 1 x 10^{-10} M, örneğin 9 x 10^{-9} M, 8 x 10^{-9} M, 7 x 10^{-9} M, 6 x 10^{-9} M, 5 x 10^{-9} M, 4 x 10^{-9} M, 3 x 10^{-9} M, 2 x 10^{-9} M, 1 x 10^{-9} M, 9 x 10^{-10} M, 8 x 10^{-10} M, 7 x 10^{-10} M, 6 x 10^{-10} M, 5 x 10^{-10} M, 4 x 10^{-10} M, 3 x 10^{-10}M, 2 x 10^{-10} M, 1 x 10^{-10} M'den az veya daha düşük Kd olan bir bağlanma afinitesine sahiptir.

Multimer doğrudan veya dolaylı olarak bir multimerizasyon sahasına bağlı bir HA bağlama yeri (örneğin G1 sahası veya bağlantı modeli) içeren bir füzyon proteininden oluşturulabilir. Multimerizasyon sahası, bir ilk HABP polipeptidinin multimerizasyon sahası ile ikinci bir HABP polipeptidinin multimerizasyon sahası arasında stabil bir protein-protein etkileşiminin oluşumunu sağlar. İlk ve ikinci HBP polipeptidi (örneğin bir bağlantı sahası veya G1 sahası içerir) aynı veya farklı olabilir. Örneğin multimer füzyon proteininin bir hücre içinde ekspresyonuyla oluşturulabilir. Elde edilen HABP-multimerizasyon sahası kimerik proteinleri rekombinant ekspresyon vektörüyle transforme edilmiş konakçı hücrelerde eksprese olabilir ve multimerizasyon sahalarının çok değerlikli polipeptitler oluşturmak üzere etkileşime girdiği multimerler halinde birleşmelerine izin verilebilir. Multimerizasyon sahalarının HABP polipeptitlerine kimyasal bağlantısı,

yukarıda açıklandığı gibi heterobifonksiyonel bağlayıcılar kullanılarak sağlanabilir. Oluşan kimerik polipeptitler ve bunlardan oluşturulan multimerler Protein A veya Protein G kolonları üzerinde afinite kromatografisi gibi herhangi bir uygun usulle saflaştırılabilir. Farklı HABP kimerik polipeptitlerini kodlayan iki nükleik asit molekülünün hücrelere transforme edildiği durumda, homodimerler ve heterodimerler oluşacaktır. Ekspresyon için koşullar homodimer oluşumuna göre heterodimer oluşumunun destekleneceği şekilde ayarlanabilir.

Örnek bir HABP, TSG-6 veya TSG-6'nın bir bağlantı modülünü (yani TSG-6-LM), bir bağlantı modülünün HA'ya bağlanmak için yeterli bir bölümünü içeren bir polipeptit veya bunların varyantları veya bir multimeridir. Tümör nekroz faktörüyle stimüle edilen Gen-6 (TSG-6, tümör nekroz faktörü alfanın uyardığı protein 6, TNFAIP6; DİZİ İD NO: 303) tek bir N terminal bağlantı modülü ve C terminal CUB sahasından oluşan ~35 kDa'lık salgılanmış bir glikoproteindir. TSG-6 ekspresyonuna birçok hücre tipinde sitokinler ve büyüme faktörleri de dâhil olmak üzere enflamatuvar mediyatörler yol açar. Bağlantı modülü sayesinde TSG-6 polimorfonükleer lökosit göçünün güçlü bir inhibitörüdür. TSG-6 serin proteaz inhibitörü İnter-alfa-İnhibitörle (IαI) stabil bir kompleks oluşturur ve IαI'nin anti-plazmin aktivitesini güçlendirir. TSG-6 HA açısından zengin periselüler katmanların ve hücre dışı matrislerin oluşumu ve yeniden modellenmesi için de önemlidir.

Beşeri TSG-6 transkripti (DİZİ İD NO: 32) normal olarak translasyondan geçerek N terminalde 17 amino asitli bir sinyal dizisi içeren 277 amino asitli bir öncü peptit (DİZİ İD NO: 303) oluşturur. Dolayısıyla, olgun TSG-6 (DİZİ İD NO: 304'te verilmektedir) DİZİ İD NO: 303'ün 18-277. amino asitlerini içeren 260 amino asitli bir proteindir (Lee ve diğerleri (1992) J Cell Biol 116:545-557). TSG-6 iki ana sahadan oluşur, bağlantı modülü ve CUB sahası. TSG-6'nın bağlantı modülünün literatürde farklı bir şekilde DİZİ İD NO: 303'ün 35-129, 36-128, 36-129 veya 36-132. amino asitlerinde bulunduğu bildirilmektedir (sırasıyla DİZİ İD NO: 305, 306, 307 veya 308 olarak verilmektedir). Bir sahanın lokuslarına referansın, hizalamalardaki farklar nedeniyle birkaç amino asitle değişebildiği anlaşılmaktadır. Dolayısıyla buradaki amaçlar için, bir TSG-6-LM DİZİ İD NO: 305-308'in herhangi birinde verilenlerin biridir veya böyle bir diziden bir, iki veya üç amino asitle farklı olabilir. CUB sahası DİZİ İD NO: 303'ün 135-246. amino asitlerinde bulunur. Beşeri TSG-6 DİZİ İD NO: 303'ün N118 ve N258 kalıntılarında iki potansiyel N ile bağlı glikana sahiptir. Ayrıca, DİZİ İD NO: 303'ün T259 ve T262 kalıntıları fosforlanmıştır (Molina ve diğerleri (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104:2199-2204). Beşeri TSG-6,

preprotein TSG-6'nın (DİZİ İD NO: 303) C58-C127, C82-C103, C135-C161 ve C188-C210 kalıntılarında dört disülfür bağı oluşturan sekiz doğal sisteine sahiptir.

TSG-6 bağlantı modülü (örneğin DİZİ İD NO: 305-308) nispeten küçük boyutludur ve iyi karakterize edilmiş bir yapıya sahiptir. TSG-6 bağlantı sahasının üç boyutlu yapısı belirlenmiş ve büyük bir hidrofobik çekirdeğin etrafında düzenlenmiş iki alfa helis ve iki ters paralel beta yaprağı içermesiyle, bilinen başka bağlantı modülleriyle aynı katlanmaya sahip olduğu tespit edilmiştir (Kohda ve diğerleri (1996) Cell 86:767-775). Ayrıca, TSG-6'nın bağlantı modülü ve HA'nın etkileşimi incelenerek, TSG-6'nın (DİZİ İD NO: 305) bağlantı sahalarının Tyr12, Tyr59, Phe70, Tyr78, Trp88 aromatik halkaları ve Lys11, Lys72, Asp77, Arg 81 ve Glu86 bazik kalıntılarının HA'ya bağlanmak için önemli olduğu ortaya konmuştur (örneğin bakınız: Kahmann ve diğerleri (2000) Structure 15:763-774; Mahoney ve diğerleri (2001) J Biol Chem 276:22764-22771; Kohda ve diğerleri (1996) Cell, 88:767-775; Blundell ve diğerleri (2003) J Biol Chem 278:49261-49270; Lesley ve diğerleri (2004) J Biol Chem 279:25745-25754; Blundell ve diğerleri (2005) J Biol Chem 280:18189-18201). Yapısal çalışmalar ayrıca bağlantı modülünde, HA bağlanmasına en dolaysız şekilde katılan Lys11, Tyr12, Tyr59, Phe70 ve Tyr78 kalıntılarının yapısal haritası temelinde molekülün bir bölgesine lokalize olan tek bir HA bağlanma yeri olduğunu göstermiştir (örneğin bakınız: Mahoney ve diğerleri (2001) J Biol Chem 276:22764-22771).

TSG-6'nın bağlantı modülü, birkaç glikozaminoglikana bağlanma aktivitesi gösterir. Örneğin, çalışmalar bağlantı modülünün HA, kondroitin-4-sülfat (C4S), proteoglikan agrekanın G1 sahası, heparin ve IαI'nin bikunin zincirine bağlandığını göstermiştir (örneğni bakınız: Milner ve diğerleri (2003) Journal of Cell Science, 116:1863-1873; Mahoney ve diğerleri (2005) Journal of Biological Chemistry, 280:27044-27055). TSG-6'nın heparine ve HA'ya bağlanmasına, TSG-6'nın LM'sindeki ayrı bir bağlanma yeri aracılık eder. TSG-6-LM'nin hiyalüronan bağlanmasında rol oynayan kalıntılar Lys11, Tyr12, Tyr59, Phe70 ve Tyr78 olup, bu nedenle mutantlar K11Q, Y12F, Y59F, F70V ve Y78F yabani tiple karşılaştırıldığında 10 kat ile 100 kat arasında daha düşük HA bağlanma afinitesine sahiptir; TSG-6-LM'de heparine bağlanmada rol oynayan kalıntılar Lys20, Lys34, Lys41, Lys54, Arg56 ve Arg84 olup, bu nedenle mutantlar K20A, K34A, K41A ve K54A bozulmuş heparin bağlama özellikleri gösterir; ve TSG-6-LM'nin bikunine bağlanmasında rol oynayan kalıntılar HA bağlanma yeriyle çakışır, ama aynı değildir (Mahoney ve diğerleri (2005) Journal of Biological Chemistry, 280:27044-27055).

TSG-6'nın hiyalüronana bağlanması pH'ye bağımlı olup, bağlanma aktivitesi pH 5.6 ila 6.4 veya yaklaşık bu aralıkta, örneğin pH 5.8 ila pH 6.0 veya yaklaşık bu aralıkta olan asidik pH'de görülür.

Yardımcı bir tanı maddesi olarak kullanım için burada sunulan TSG-6 polipeptitleri, bunların HA bağlama sahaları, örneğin TSG-6 bağlantı modülleri veya bunların HA'ya bağlanmak için yeterli olan fragmanları arasında DİZİ İD NO: 303-308'in herhangi birini veya bunların varyantlarını, örneğin DİZİ İD NO: 303-308'in herhangi birine en az %65, %70, %75, %80, %85, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya daha fazla dizi özdeşliği gösteren varyantları yer alabilir. Örnek varyantlar arasında örneğin tür varyantları, alelik varyantlar ve koruyucu ve koruyucu olmayan amino asit mutasyonları içeren varyantlar yer alır. Beşeri TSG-6'nın doğal alelik varyantları arasında örneğin Q144R amino asit ikamesini içeren TSG-6 yer alır (Nentwich ve diğerleri (2002) J Biol Chem 277:15354-15362). TSG-6 türler arasında son derece korunmuş olup, fare ve beşeri protein >%94 özdeştir.

Sunulan usullerde kullanım için TSG-6 varyantları veya bunların HA bağlayıcı fragmanları arasında, bir amino asit ikamesi (sübstitüsyon), silinmesi veya eklenmesi olan bir amino asit modifikasyonunu haiz varyantlar yer alır. Örnek modifikasyonlar, DİZİ İD NO: 305'te verilen TSG-6'daki kalıntılara karşılık gelen amino asit kalıntıları 4, 6, 8, 13, 20, 29, 34, 41, 45, 54, 67, 72 veya 96'nın herhangi birindeki bir amino asit ikamesi gibi amino asit ikameleridir. İkame amino asit herhangi bir başka amino asit kalıntısı olabilir. Bir yardımcı tanı maddesi olarak burada kullanım için sunulan TSG-6 polipeptitlerinin veya bunların HA bağlayıcı fragmanlarının örnek amino asit ikameleri arasında DİZİ İD NO: 305'te verilen TSG-6'daki kalıntılara karşılık gelen H4K, H4S, E6A, E6K, R8A, K13A, K20A, H29K, K34A, K41A, H45S, K54A, N67L, N67S, K72A, H96K, K34A/K54A veya K20A/K34A/K41A'ya karşılık gelen en az bir amino asit ikamesi içeren modifiye TSG-6 polipeptitleri veya bunların HA bağlayıcı fragmanları yer alır (örneğin bakınız: Mahoney ve diğerleri (2005) J Biol Chem 280:27044-27055, Blundell ve diğerleri (2007) J Biol Chem 282:12976-12988, Lesley ve diğerleri (2004) J Biol Chem 279:25745-25754, Kahmann ve diğerleri (2000) Structure 15:763-774). Yukarıda açıklananların veya bu alanda uzman olanlar tarafından bilinenlerin herhangi biri gibi, TSG-6'nın HA'ya bağlanması için önemli veya gerekli olan kalıntıların genellikle sabit olduğu ve değişemeyeceği takdir edilecektir. Dolayısıyla örneğin TSG-6'nın bağlantı modülündeki DİZİ İD NO: 305'in 11, 12, 59, 70, 78 ve 81. amino asit kalıntıları genellikle sabittir ve

değişemez. Ayrıca, bağlantı modülünün yanlış katlanmasıyla veya katlanmasının bozulmasıyla sonuçlanan amino asit modifikasyonlarının genellikle sabit olduğu takdir edilecektir. Dolayısıyla örneğin modifiye edilmiş bir TSG-6, DİZİ İD NO: 305'in H4S, H29A, H45A, H45K, R56A, D77A, R84A ve D89A amino asit modifikasyonlarının herhangi birini veya daha fazlasını içermeyecektir (Mahoney ve diğerleri (2005) J Biol Chem 280:27044-27055, Blundell ve diğerleri (2007) J Biot Chem 282:12976-12988, Lesley ve diğerleri (2004) J Biot Chem 279:25745-25754).

Özellikle, modifikasyon, örneğin amino asit ikamesi veya ikameleri, modifikasyonu içermeyen bir TSG-6'ya kıyasla değişmiş, örneğin artmış aktivite sağlayanlardır. Bu varyantlar arasında, TSG-6'nın HA'ya bağlanma afinitesini arttıran, TSG-6'nın HA için spesifitesini arttıran ve/veya TSG-6'nın çözünürlüğünü arttıran amino asit modifikasyonları içerenler yer alır. Örneğin buradaki usullerde kullanım için burada TSG-6'nın heparin, kondroitin-4-sülfat, heparan sülfat ve dermadan sülfat da dâhil olmak üzere başka glikozaminoglikanlara bağlanmasını azaltarak TSG-6'nın HA için spesifitesini arttıran TSG-6 varyantları, HA bağlama sahaları veya bunların HA'yı bağlamak için yeterli bölümleri sunulmaktadır. Hiyalüronan olmayan başka glikozaminoglikana bağlanma, modifikasyonu içermeyen TSG-6-LM'nin bağlanmasıyla kıyaslandığında en az 1.2 kat, 1.5 kat, 2 kat, 3 kat, 4 kat, 5 kat, 6 kat, 7 kat, 8 kat, 9 kat, 10 kat, 20 kat, 30 kat, 40 kat, 50 kat, 100 kat veya daha fazla azaltılabilir. Örneğin burada amino asit kalıntıları 20, 34, 41, 54, 56, 72 ve/veya 84'te ve özellikle amino asit kalıntıları 20, 34, 41 ve/veya 54'te (DİZİ İD NO: 303'te verilen amino asit kalıntılarına karşılık gelir) amino asit ikamesi/ikameleri içeren bir mutant TSG-6-LM sunulmaktadır. İkame amino asit herhangi bir başka amino asit kalıntısında olabilir ve genellikle bazik olmayan bir amino asit kalıntısındadır. Örneğin amino asit ikamesi Asp (D), Glu (E), Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q), Ala (A), Val (V), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Tyr (Y) veya Trp'de (W) olabilir. Amino asit ikamesi veya ikameleri heparine bağlanmayı azaltır. Örneğin, TSG-6'nın heparine bağlanma kabiliyetini azaltan varyantlar bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir. Bu varyantlar, K34A/K54A veya K20A/K34A/K41A varyantları da dâhil olmak üzere K20A, K34A, K41A ve K54A'ya karşılık gelen en az bir mutasyon içerenlerdir (Mahoney ve diğerleri (2005) J Biol Chem 280:27044-27055). Heparine bağlanmayı azaltan veya düşüren örnek varyantlar DİZİ İD NO: 309 veya 310'da verilen varyant TSG-6-LM'dir.

Yardımcı bir tanı maddesi olarak örnek bir TSG-6 polipeptidi, en az bir HA bağlayıcı saha, örneğin bir TSG-6 bağlantı modülü içeren bir TSG-6 polipeptididir. Dolayısıyla, burada

sunulan usullerde kullanım için bir TSG-6 bağlantı modülü veya bunun bir varyantı sunulmaktadır. Böyle bir polipeptit tepkime maddesinin bir örneği DİZİ İD NO: 305-310'da verilen bir amino asit dizisine sahip olan veya DİZİ İD NO: 305-310'un herhangi birine en az %65, %70, %75, %80, %85, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %95, %99 veya daha fazla dizi özdeşliği gösteren bir amino asit dizisine sahip olan bir polipeptittir. Örneğin TSG-6 bağlantı modülü, HA'ya bağlanma kabiliyeti korunduğu sürece spesifitesini, afinitesini veya çözünürlüğünü değiştirmek için modifiye edilebilir.

Yine başka bir örnekte, TSG-6 bağlantı modülünün afinitesi, dimerizasyon veya multimerizasyonla, örneğin bir Fc sahası gibi bir multimerizasyon sahasına füzyonla arttırılır. Dolayısıyla, TSG-6 bağlantı modülü, dimer veya trimer moleküllerinin oluşumunu ve birden fazla HA bağlanma yerinin oluşturulmasını sağlamak için, doğrudan veya dolaylı olarak bir multimerizasyon sahası vasıtasıyla bağlanan iki veya daha fazla bağlantı modülü içeren bir multimer üretmek üzere modifiye edilebilir. Örneğin bir yardımcı tanı maddesi, DİZİ İD NO: 305-310'un herhangi birinde verilen bağlantı modülünü kodlayan bir nükleik asit molekülünün veya doğrudan veya dolaylı olarak bir immünoglobülinin bir Fc bölümü gibi bir multimerizasyon sahasını kodlayan bir nükleik aside bağlı DİZİ İD NO: 305-310'un herhangi birinde verilen bir diziye en az %65, %70, %75, %80, %84, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliği gösteren bir amino asit dizisine sahip bir bağlantı modülünü kodlayan bir nükleik asidin ekspresyonuyla üretilen bir tanı maddesidir. Dolayısıyla, elde edilen TSG-6-LM multimeri, DİZİ İD NO: 305-310'un herhangi birinde verilen bir ilk polipeptidi veya doğrudan veya dolaylı olarak bir multimerizasyon sahasına bağlı DİZİ İD NO: 305-310'un herhangi birinde verilen bir diziye en az %65, %70, %75, %80, %84, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliği gösteren bir amino asit dizisini; ve DİZİ İD NO: 305-310'un herhangi birinde verilen ikinci bir polipeptidi veya doğrudan veya dolaylı olarak bir multimerizasyon sahasına bağlı DİZİ İD NO: 305-310'un herhangi birinde verilen bir diziye en az %65, %70, %75, %80, %84, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliği gösteren bir amino asit dizisini içerir. Genellikle, LM veya bunun HA bağlanması sağlamak için yeterli bölümü multimerin tek TSG-6 bölümüdür.

Örnek HABP-Fc kimerik polipeptitleri arasında TSG-6 bağlantı modülü (TSG-6-LM) ve Fc'nin füzyon proteini yer alır. Örneğin, TSG-6-LM:Fc molekülü DİZİ İD NO: 312 veya 313'te verilenlerin biri olabilir. Örnek bir TSG-6-LM-Fc DİZİ İD NO: 312'de verilmekte

ve DİZİ İD NO: 314 veya 316'da verilen bir nükleotit dizisiyle kodlanmaktadır. Örnek bir TSG-6-LM-Fc DİZİ İD NO: 313'te verilmekte ve DİZİ İD NO: 315'te verilen bir nükleotit dizisi tarafından kodlanmaktadır. Ayrıca örneğin örnek TSG-6-Fc molekülleri de dâhil olmak üzere HABP-Fc molekülleri isteğe bağlı olarak ekspresyon ve salgılama için bir epitop etiketi veya bir sinyal içerebilir. Örneğin, DİZİ İD NO: 312'de verilen örnek TSG-6-LM-Fc kimerik polipeptidi beşeri immünoglobülin hafif zincir kappa (κ) lider sinyal peptidi dizisi, beşeri IgG1 ağır zincirin (DİZİ İD NO: 311) bir Fc fragmanı ve bir beşeri TSg-6 bağlantı modülü (DİZİ İD NO: 306) içerir. TSG-6-LM-Fc kimerik polipeptidini kodlayan cDNA dizisi DİZİ İD NO: 314'te verilmektedir.

ii. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Usuller

Bir tümörden alınan bir numune gibi alınan bir numunedeki hiyalüronan seviyeleri bir HABP'nin bir numunedeki HA'ya bağlanma kabiliyeti temelinde ve HABP saptanarak ölçülebilir, saptanan HABP yardımcı tanı maddesi miktarı, numunedeki HA miktarıyla bağlantılıdır. Sınırlandırıcı olmamak koşuluyla sitokimyasal veya histokimyasal usuller, örneğin antikor olmayan bir bağlama maddesinin kullanıldığı immünohistokimya (IHC) veya histokimya (örneğin psödo immünohistokimya) dâhil olmak üzere bu alanda uzman olanların bildiği doku boyama usulleri kulllanarak HA'yı saptamak için herhangi bir HABP yardımcı tanı maddesi kullanılabilir. Bu histokimyasal usuller bir tümör dokusu numunesi gibi bir numunede HA'ya bağlanan HABP miktarının nicel veya yarı nicel saptamasına izin verir. Bu usullerde, bir doku numunesi burada sunulan bir HABP tepkime maddesiyle ve özellikle, dokuyla veya hücreyle ilişkili HA'ya bağlanmaya izin veren koşullar altında, saptanabilir bir şekilde işaretlenen veya saptanabilen bir HABP tepkime maddesiyle temas ettirilebilir.

Histokimyayla HA seviyelerini belirlemek için bir numune, bir doku, örneğin bir tümör dokusu veya hücresel numune gibi, HA seviyeleri açısından analiz edilebilen herhangi bir biyolojik numune olabilir. Örneğin bir doku numunesi, katı doku, örneğin taze, dondurulmuş ve/veya korunmuş organ veya doku numunesi veya biyopsi veya aspirat veya hücreler olabilir. Bazı örneklerde, doku numunesi, sınırlandırıcı olmamak koşuluyla meme, kolon, rektum, akciğer, mide, yumurtalık, rahim ağzı, rahim, testis, mesane, prostat, tiroit ve akciğer kanseri tümörleri de dâhil olmak üzere primer ve metastatik tümörler gibi bir katı tümörden elde edilen doku veya hücrelerdir. Özel örneklerde, numune bir geç evre kanser, bir metastatik kanser, başkalaşım göstermeyen kanser, yumurtalık kanseri, in situ

karsinom (ISC), skuamöz hücreli karsinom (SCC), prostat kanseri, pankreas kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri olan bir kanserden bir doku numunesidir. Başka örneklerde, doku numunesi primer veya kültürlenmiş hücrelerden veya hücre hatlarından hücreler içerir. Hücreler çeşitli farklılaşma durumlarında olabilir ve normal, kanser öncesi veya kanserli olabilir, taze dokular, dağılmış hücreler, olgunlaşmamış hücreler, örneğin kök hücreler, orta olgunlukta hücreler ve tam olgunlukta hücreler olabilir. Tipik olarak, burada sunulan usullerde kullanım için seçilen hücreler kanser hücreleridir.

Tümör bir katı tümör olduğunda, tümör hücrelerinin izolasyonu tipik olarak cerrahi biyopsiyle sağlanır. Bir hastadan tümör hücreleri almak için kullanılabilen biyopsi teknikleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla iğne biyopsisi, CT rehberliğinde iğne biyopsisi, aspirasyon biyopsisi, endoskopik biyopsi, bronkoskopik biyopsi, bronş lavajı, insizyonla biyopsi, eksizyonla biyopsi, zımba biyopsi, tıraş biyopsisi, cilt biyopsisi, kemik iliği biyopsisi ve Döngü Elektrocerrahi Eksizyon Prosedürü (LEEP) yer alır. Tipik olarak, 100 mg'den büyük olan, ama daha küçük, örneğin 100 mg'den az, 50 mg veya daha az, 10 mg veya daha az veya 5 mg veya daha az; veya daha fazla, örneğin 100 mg'den büyük, 200 mg veya daha fazla veya 500 mg veya daha fazla, 1 g veya daha fazla, 2 g veya daha fazla, 3 g veya daha fazla, 4 g veya daha fazla veya 5 g veya daha fazla olabilen, nekrotik olmayan, steril bir biyopsi veya örnek alınır. Tahlil için ekstrakte edilecek numune büyüklüğü sınırlandırıcı olmamak koşuluyla yapılacak tahlil sayısı, doku numunesinin sağlığı, kanser tipi ve hastanın durumu da dâhil olmak üzere bir dizi faktöre dayanabilir. Tümör dokusu bir steril tüp veya kültür plakası gibi steril bir kaba yerleştirilir ve isteğe bağlı olarak uygun bir ortam içine daldırılabilir.

Biyopsiden sonra hastadan alınan doku çoğunlukla, örneğin formalin (formaldehit) veya glutaraldehit kullanılarak, örneğin alkole daldırılarak sabitlenir. Histokimyasal usuller için, tümör numunesi dehidratasyon ve tümör dokusunu parafin mumu veya bu alanda uzman olanların bildiği başka katı destekler (bakınız: Plenat ve diğerleri, (2001) Ann Pathol January 21(1):29-47) içine gömme, dokuyu boyama için uygun kesitler halinde dilimleme ve organik çözücülerle gömme için katı desteklerin uzaklaştırılması da dâhil olmak üzere kesitleri seçilen histokimyasal boyama usulüne uygun boyama için işlemden geçirme ve korunmuş dokunun yeniden hidratasyonu gibi bilinen teknikler kullanılarak işlemden geçirilebilir. Dolayısıyla, buradaki usullerde kullanım için numuneler koruyucular,

antikoagülanlar, tamponlar, sabitleyiciler, besleyiciler ve antibiyotikler de dâhil olmak üzere bir doku veya hücre numunesinde doğal olarak bulunmayan bileşikleri içerebilir.

Bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle tedavi için bir hastayı seçmenin örnek usullerinde, genellikle hastanın bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle tedavisinden önce tümör dokusu alınır. Bir tümörün bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle tedavisini izlemenin örnek usullerinde, hastadan tümör dokusu, hasta bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle bir veya daha fazla tedaviyi almadan önce, tedavi sırasında veya tedaviden sonra alınabilir.

Bir numunede bulunan HA'yı ölçmek için tahliller, histokimya veya immünohistokimya kullanılarak saptanır. Histokimya (HC), doku antijenleri veya biyomarkörler, örneğin HA gibi hücreleri veya spesifik proteinleri saptamak için bir antikor (örneğin monoklonal veya poliklonal antikorlar) gibi bir bağlanma ortağının veya başka bir bağlanma ortağının kullanıldığı enzimatik reaksiyonlara dayanan bir boyama usulüdür. Örneğin histokimya tahlilleri arasında, hücreler veya dokularla, özellikle kanser dokularıyla ilişkili HA'yı saptamak için bir bağlanma ortağı olarak bir HABP'nin kullanıldığı tahliller yer alır. Tipik olarak, histokimya protokolleri, nitel veya nicel analizler için, markörlerin varlığını insan gözüyle veya bir otomatik tarama sistemiyle görünebilir hale getiren saptama sistemlerini içerir. Dolaysız bir HC tahlilinde, bağlanma doğrudan bağlanma ortağının (örneğin ilk antikor) işaretlenmiş bir tepkime maddesinin kullanımına bağlı olarak dokuya veya biyomarköre bağlanması üzerine belirlenir. Dolaylı bir HC tahlilinde, işaretlenmediği için, ilk bağlanma ortağının bağlanmasını saptamak için ikinci bir antikor veya ikinci bir bağlanma ortağı gereklidir.

Bu tür usullerde, genellikle, lama yerleştirilmiş bir doku numunesi yaygın histokimya teknikleri kullanılarak işaretlenmiş bir bağlama maddesiyle (örneğin işaretlenmiş HABP) boyanır. Dolayısıyla bazı HC tahlillerinde, HABP veya anti-HA antikoru, bir floresan protein, biyolüminesan protein veya enzim gibi saptanabilir bir kısım içermek üzere modifiye edilir. Bazı örneklerde, HABP veya anti-HA antikoru, işaretlenmiş bir bağlanma ortağı veya antikor vasıtasıyla saptanan küçük bir moleküle, örneğin biyotine konjuge edilir. Bazı örneklerde, IHC usulü, yaban turpu peroksidazla enzimatik boyamayla saptanan bir HABP veya antikorla boyanmayı esas alır. Örneğin, HABP veya anti-HA antikoru biyotinlenebilir ve streptavidin-yaban turpu peroksidaz gibi, saptanabilir proteine konjuge edilmiş avidin veya streptavidinle saptanır. Başka örneklerde HABP veya anti-HA antikoru bir floresan protein, biolüminesan protein veya enzime konjuge edilmiş HABP

yardımcı tanı maddesi gibi doğrudan saptamaya izin veren saptanabilir proteinlere konjuge edilir. İlgilenilen bir proteini saptamak için bu alanda çeşitli enzimatik boyama usulleri bilinmektedir. Örneğin enzimatik etkileşimler farklı enzimler, örneğin peroksidaz, alkalin fosfataz veya DAB, AEC veya Fast Red gibi farklı kromojenler kullanılarak görselleştirilebilir. Başka örneklerde, HABP yardımcı tanı maddeleri işaretlenmiş bir bağlanma ortağı veya antikor vasıtasıyla saptanabilen peptitlere veya proteinlere konjuge edilir.

Elde edilen boyanmış numunelerin her biri, saptanabilir sinyali görmek ve boyanmanın bir dijital görüntüsü gibi bir görüntü elde etmek için bir sistem kullanılarak görüntülenir. Görüntü elde etmek için usuller bu alanda uzman olanlar tarafından iyi bilinmektedir. Örneğin numune boyandıktan sonra, boya veya biyomarkör işaretini saptamak için herhangi bir optik veya optik olmayan görüntüleme aygıtı, örneğin dik veya ters optik mikroskoplar, tarayıcı eş odaklı mikroskoplar, kamaralar, tarama veya tünelleme elektron mikroskopları, taramalı sondalı mikroskoplar ve görüntüleyici enfraruj detektörlerle kullanılabilir.

Bazı örneklerde, görüntü dijital olarak elde edilebilir. Elde edilen görütüler daha sonra numunedeki HA miktarını nicel veya yarı nicel olarak belirlemek için kullanılabilir. Bu alanda, immünohistokimyayla birlikte kullanım için uygun çeşitli otomatik numune işleme, tarama ve analiz sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler arasında otomatik boyama ve mikroskopik tarama, bilgisayarlı görüntü analizi, seri kesit karşılaştırma (bir numunenin yönelimi ve büyüklüğündeki değişikliği kontrol etmek için), dijital rapor üretimi ve numunelerin arşivlenmesi ve takibi (doku kesitlerinin yerleştirildiği lamlar gibi) yer alır.

İmmünolojik olarak boyanmış numuneler de dâhil olmak üzere hücreler ve dokular üzerinde nicel analiz yapmak için geleneksel ışık mikroskoplarını dijital görüntü işleme sistemleriyle kombine eden hücre görüntüleme sistemleri piyasada bulunmaktadır. Örneğin bakınız: CAS-200 sistemi (Becton, Dickinson & Co.). Özellikle, saptama manuel olarak veya bilgisayar işlemcileri ve yazılımını gerektiren görüntü işleme teknikleriyle yapılabilir. Böyle bir yazılım kullanılarak, bu alanda uzman olanların bildiği prosedürlerle, örneğin boya kalitesi veya boya yoğunluğunu da kapsayan faktörler esas alınarak görüntüler konfigüre, kalibre, standardize edilebilir ve/veya doğrulanabilir (örneğin bakınız: yayımlanmış ABD Patent Başvurusu No. US20100136549).

Görüntü nicel veya yarı nicel olarak analiz edilebilir ve numunenin boyanma yoğunluğu esas alınarak değerlendirilir. Nicel veya yarı nicel histokimya, bir antijen veya başka protein (örneğin HA) gibi belirli bir biyomarkörün varlığını belirlemek ve ölçmek için, histokimya uygulanmış numuneleri tarama ve değerlendirme usulünü belirtir. Nicel veya yarı nicel usullerde, boyanma yoğunluklarını veya boyanma miktarını saptamak için görüntüleme yazılımı veya eğitimli bir operatörün sonuçları sayısal olarak tasnif ettiği, boyanmayı insan gözüyle saptama usulleri kullanılabilir. Örneğin piksel sayım algoritmaları (örneğin Aperio Spectrum Software, Automated QUantitatative Analysis platform (AQUA® platform)) ve boyanma derecesini ölçen veya nicel veya yarı nicel olarak belirleyen başka standart usuller kullanılarak görüntüler nicel olarak analiz edilebilir; örneğin bakınız: ABD Patenti No. 8,023,714; ABD Patenti No. 7,257,268; ABD Patenti No. 7,219,016; ABD Patenti No. 7,646,905; yayımlanmış ABD Patent Başvuruları No. US20100136549 ve 20110111435; Camp ve diğerleri (2002) Nature Medicine, 8:1323-1327; Bacus ve diğerleri(1997) Analyt Quant Cytol Histol, 19:316-328). Güçlü pozitif boyamanın (kahverengi boyanma gibi) toplam boyanmış alanın toplamına oranı hesaplanabilir ve değerlendirilebilir.

İmmünohistokimyasal veya psödo immünohistokimyasal usuller gibi histokimyasal usuller kullanılarak, saptanan HA miktarı nicel olarak belirlenir ve HA pozitif piksellerin bir yüzdesi ve/veya bir skor olarak belirtilir. Orta ila yüksek hiyalüronan eksprese eden bir tümörü seçmek için spesifik skor, ampirik olarak, örneğin HA için tümörlerin skorunu belirlemek için yayımlanmış veya bilinen kriterler esas alınarak belirlenebilir. Genellikle, HA'yı aşırı eksprese ettiği bilinen bir tümör hücresi (PC3 ksenogreft tümör dokusu veya HAS2 veya HS3 genlerinin ekspresyonuyla HA'yı aşırı eksprese etmek üzere oluşturulmuş tümörler gibi), pozitif piksel miktarı için yoğunluk eşiğini belirlemek üzere bir pozitif kontrol dokusu olarak işlev görebilir. HA boyanması, HABP ilavesinden önce bir hiyalüronidazla kesitlerin bir alt kümesi sindirilerek de teyit edilebilir.

Örneğin numunede saptanan HA miktarı HA pozitif piksellerin bir yüzdesi olarak ölçülebilir. Bazı örneklerde, bir numunede bulunan HA miktarı boyanan alanın yüzdesi, yani HA pozitif piksellerin yüzdesi olarak ölçülür. Örneğin, bir numune toplam boyanma alanıyla karşılaştırıldığında en az veya yaklaşık en az veya yaklaşık %0, %1, %2, %3, %4, %5, %6, %7, %8, %9, %10, %11, %12, %13, %14, %15, %16, %17, %18, %19, %20, %21, %22, %23, %24, %25, %26, %27, %28, %29, %30, %31, %32, %33, %34, %35,

%40, %45, %50, %55, %60, %65, %70, %75, %80, %85, %90, %95 veya daha fazla HA pozitif piksele sahip olabilir.

Bazı örneklerde numuneye, numunenin histokimyasal boyanmasının yoğunluğunun veya miktarının sayısal bir temsili olan bir skor verilir ve bu numunede bulunan hedef biyomarkörün (örneğin HA) miktarını temsil eder. Optik yoğunluk veya alan yüzdesi değerleri, örneğin 0-10, 0-5 veya 0-3 gibi bir tamsayı ölçeğinde ölçeklendirilmiş bir skor olarak verilebilir. Özel örneklerde, bir numunedeki hiyalüronan miktarı, 0-3 ölçeğinde sınıflandırılır, örneğin 0, HA+1 (düşük), HA+ (orta) ve HA+3 (yüksek). Var olan HA miktarı, HA pikselleri yüzdesine göredir, yani düşük HA pikselleri yüzdesi düşük bir HA seviyesini belirtir, yüksek HA pikselleri yüzdesi ise yüksek HA seviyelerini belirtir. Boyanan alan yüzdesi sırasıyla hiç boyanma yok, %10'dan az boyanma, %10-25 boyanma veya %25'ten fazla boyanmayı temsil eden 0, HA+1, HA+2 ve HA+3 olacak şekilde skorlar HA pozitif piksellerin yüzdesiyle bağlantılandırılabilir. Örneğin oran (örneğin güçlü piksel boyanmasının toplam boyanan alana oranı) %25'ten fazlaysa tümör dokusunun skoru HA+3'tür, güçlü pozitif boyanmanın toplam boyanmaya oranı %10-25'se tümör dokusunun skoru HA+2'dir, güçlü pozitif boyanmanın toplam boyanmaya oranı %10'un altındaysa tümör dokusunun skoru HA+1'dir, güçlü pozitif boyanmanın toplam boyanmaya oranı 0'sa tümör dokusunun skoru 0'dır. 0 veya HA+1 skoru test edilen numunede düşük HA seviyelerini belirtir. HA+2 veya HA+3 skoru ise, test edilen numunelerde orta ila yüksek HA seviyelerini belirtir.

iii. Katı Faz Bağlanma Tahlilleri

Bir numunede HA miktarını nicel veya yarı nicel olarak belirlemek için katı faz bağlanma tahlilleri de kullanılabilir. Bir numunede hiyalüronan ekspresyonunu veya seviyelerini değerlendirmek, belirlemek, ölçmek ve/veya başka türlü spesifik olarak saptamak için kullanılabilen örnek katı faz bağlanma tahlilleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA), radyoimmün tahlil (RIA), immünoradyometrik tahlil, florometrik tahlil, kemilüminesan tahlil, biyolüminesan tahlil yer alır. Örneğin, enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) veya sandviç ELISA veya rekabetçi ELISA tahlili de dâhil olmak üzere benzer başka bağışıklık tahlilleri de dâhil olmak üzere bu alanda uzman olanların bildiği herhangi bir katı faz bağlanma tahlili kullanılarak HA'yı saptamak için bir HABP veya anti-HA antikoru kullanılabilir. Burada sunulan örnek usuller arasında, bir tümör dokusu numunesi veya tümörü olan veya tümörü

olduğundan kuşkulanılan bir hastadan alınan sıvı numunesi gibi bir numunede HA'ya bağlanan HABP miktarının nicel veya yarı nicel saptaması için ELISA bazlı usuller yer alır. Bir vücut sıvısında HA saptandığında katı faz bağlanma tahlilleri kullanılabilir.

Tümör dokusunda yüksek hiyalüronan üretim seviyeleri gösteren hastalar, kanda ve başka sıvı numunelerinde de yüksek hiyalüronan seviyeleri gösterir. Kanser gibi HA'yla ilişkili bir hastalıkta HA üretiminin analizi için sıvı örnekleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla serum, idrar, plazma, beyin-omurilik sıvısı ve lenf yer alır. Hastada bir kanser, örneğin meme, kolon, rektum, akciğer, mide, yumurtalık, rahim ağzı, rahim, testis, mesane, prostat ve trioitte primer ve metastatik tümörler olabilir veya olduğundan kuşkulanılabilir. Özel örneklerde, kanser geç evre bir kanser, metastatik bir kanser, başkalaşım göstermeyen kanser, yumurtalık kanseri, in situ karsinom (ISC), skuamöz hücreli karsinom (SCC), prostat kanseri, pankreas kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, meme kanseri veya kolon kanseridir.

Tedavi için hastaları seçmenin örnek usullerinde, bir hastadan bir sıvı numunesi genellikle hastanın burada açıklandığı gibi tedavi edilmesinden önce alınır. Bir tümörün bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle terapisinin izlenmesinin örnek usullerinde, bir hastadan sıvı numunesi, hasta bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle bir veya daha fazla kez tedavi edilmeden önce, tedavi sırasında veya tedaviden sonra alınabilir. Sıvı numunesi hastaya bir veya daha fazla kanser tedavisi döngüsünün, örneğin radyasyon ve/veya kemoterapi tedavisinin uygulanmasından önce, sırasında veya sonrasında da alınabilir.

Daha sonra sıvı numunesi bir katı faz bağlanma tahlili kullanılarak HA'ın varlığı veya miktarı açısından değerlendirilebilir. Katı faz bağlanma tahlilleri, bir katı yüzeyde sabitlenmiş veya hareketsizleştirilmiş bir bağlama maddesine substratın bağlanmasıyla bir sıvı numnede bir substratı (örneğin HA) saptayabilir. Saptanabilir bir işarete (örneğin bir enzim) bağlanmış substrata spesifik bir antikor veya bağlanma proteini (örneğin burada sunulan bir HABP) substrata uygulanır ve bağlanmasına izin verilir. Daha sonra antikorun veya bağlı poteinin varlığı saptanır ve ölçülür. Saptama ve nicelik belirleme usulleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla kolorimetrik, floresan, lüminesan veya radyoaktif usuller yer alır. Saptama usulü seçimi kullanılan saptanabilir işarete bağlıdır. Bazı örneklerde, bir kolorimetrik reaksiyonda antikora bağlı enzim kullanılır. Örneğin, bu usulde yaygın olarak kullanılan enzimler arasında yaban turpu peroksidaz ve alkalin fosfataz yer alır. Numunede bulunan substrat miktarı oluşan renk miktarıyla orantılıdır.

Nicel doğruluğu arttırmak için genellikle bir substrat standardı kullanılır. Bir numunedeki HA konsantrasyonu verilerin standart bir eğriye interpolasyonuyla hesaplanabilir. HA miktarı sıvı numunesinin bir konsantrasyonu olarak ifade edilebilir.

Kanserde hiyalüronan ekspresyonunun saptanması için bilinen usuller arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla, mesane kanseri olan hastaların idrarında veya mesane dokusu ekstraktlarında HA seviyelerini ölçmek için Lokeshwar ve diğerleri tarafından, (1997) Cancer Res. 57: 773-777'de açıklanan ELISA'ya benzer tahlil yer alır (ayrıca floresanla işaretlenmiş HA'nın kullanıldığı floresan bazlı bir tahlilin açıklandığı Veiseh ve diğerleri, (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 29:111(17):E1731-9; ve Yayımlanmış Uluslararası PCT başvurusu No. WO2009/128917'ye bakınız). Tahlil için, idrar veya ekstraktlar mikrokuyucuk plakaları üzerine kaplanır (bir standart olarak ayrıca göbek bağı HA kaplanır), ardından burada açıklananlar gibi bir işaretlenmiş (örneğin biyotinlenmiş) HA bağlama proteiniyle inkübasyon (örneğin 16 saat, oda sıcaklığı) uygulanır, yıkanır ve kuyucuklara bağlı HA bağlama proteininin niceliği bir avidin-biyotin saptama maddesi substratı kullanılarak belirlenir. Bu usuller bu alanda iyi bilinmektedir. Bir örnekte, HA'yla ilişkili mesane kanseri olan bir hastadan alınan idrar, normal hastalardan (sağlıklı denekler veya başka gastroüriner hastalıkları veya rahatsızlıkları olan hastalar) alınan idrara/ekstraktlara kıyasla 2-9 kat yüksek HA seviyeleri içeriyordu; dolayısıyla idrardaki HA seviyeleri normal deneklere göre yükselmişse, örneğin normal denekle karşılaştırıldığında 2 kat veya yaklaşık 2 kat ve 9 kat veya yaklaşık 9 kat, örneğin 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 veya 9 kat veya yaklaşık bu kadar artmışsa markör saptanacaktır.

iv. İn vivo Görüntüleme Tahlilleri

Buradaki bazı örneklerde, HA miktarı *in vivo* görüntüleme usulleri kullanılarak saptanır. Bu usullerde, bir HABP, örneğin TSG-6 veya bunun bir varyantı, örneğin bunun bir multimeri veya bir anti-HA antikoru saptanabilir bir kısma veya bir görüntüleme usulüyle saptanabilen bir kısma konjuge edilir. Örnek görüntüleme usulleri arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla floresan görüntüleme, X ışınları, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) gibi manyetik rezonans usulleri ve bilgisayarlı tomografi (CT), bilgisayarlı eksenel tomografi (CAT), elektron ışını bilgisayarlı tomografi (EBCT), yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (HRCT), hiposikloidal tomografi, pozitron emisyonu tomografisi (PET), tek foton emisyonu bilgisayarlı tomografisi (SPECT), spiral bilgisayarlı tomografi ve ultrasonik tomografi gibi

tomografik usuller yer alır. Örneğin floresanla görüntüleme için, floresan sinyalleri bir floresan mikroskopu veya floresan stereomikroskopu kullanılarak analiz edilebilir. Ayrıca az ışıkla görüntüleme kamerası da kullanılabilir.

Özellikle, HABP veya antikor, sınırlandırıcı olmamak koşuluyla görüntülendiğinde manyetik rezonans görüntüleme (MRI), tek foton emisyonu bilgisayarlı tomografisi (SPECT), pozitron emisyonu tomografisi (PET), sintigrafi, gama kamera, bir β+ detektör, bir γ detektör, floresan görüntüleme ve biyolüminesan görüntülemeyle olduğu gibi *in vivo* saptanabilen bir sinyal temin eden veya bir sinyali uyarabilen bir kısımla işaretlenir veya konjuge edilir. Örnek görüntüleme/izleme usulleri arasında manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) gibi çeşitli manyetik rezonans usullerinin herhangi biri yer alır ve ayrıca bilgisayarlı tomografi (CT), bilgisayarlı eksenel tomografi (CAT), elektron ışını bilgisayarlı tomografi (EBCT), yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (HRCT), hiposikloidal tomografi, pozitron emisyonu tomografisi (PET), gama ışınları (PET taramasında bir pozitron ve bir elektronun imhasından sonra), tek foton emisyonu bilgisayarlı tomografisi (SPECT), spiral bilgisayarlı tomografi ve ultrasonik tomografi gibi tomografik usullerin herhangi biri yer alır. Diğer örnek görüntüleme usulleri arasında az ışıkta görüntüleme, X ışınları, ultrason sinyali, floresan emilimi ve biyolüminesans yer alır. Ayrıca, proteinler, ışık yayan veya başka elektromanyetik spektrum yayan bileşikler, örneğin floresan bileşikler veya moleküllerle işaretlenebilir. Saptama, yayılan ışık veya başka yayılan elektromanyetik radyasyon saptanarak yapılabilir.

Saptanabilir işaretler arasında, doğrudan saptanabilir elementler (örneğin radyoaktif işaretler) ve dolaylı olarak saptanabilen elementleri olan tepkime maddeleri (örneğin bir reaksiyon ürünü) yer alır. Saptanabilir işaretlerin örnekleri arasında radyoizotoplar, biyolüminesan bileşikler, kemilüminesan bileşikler, floresan bileşikler, metal şelatlar ve enzimler yer alır. Saptanabilir bir işaret kimyasal veya rekombinant usullerle bir HABP içine dâhil edilebilir.

X-ışını görüntüleme için uygun işaretler bu alanda bilinmekte ve bunlar arasında örneğin Bizmut (III), Altın (III), Lantan (III) veya Kurşun (II); ^{67}Bakır, ^{67}Galyum, ^{68}Galyum, ^{111}İndiyum, ^{113}İndiyum, ^{123}İyot, ^{125}İyot, ^{131}İyot, ^{197}Cıva, ^{203}Cıva, ^{116}Fenyum, ^{188}Renyum, ^{97}Rubidyum, ^{103}Rubidyum, ^{99}Teknetyum veya ^{90}İtriyum gibi bir radyoaktif iyon; Kobalt (II), Bakır (II), Krom (III), Disprosyum (III), Erbiyum (III), Gadolinyum (III), Holmiyum

(III), Demir (II), Demir (III), Manganez (II), Neodim (III), Nikel (II), Samaryum (III), Terbiyum (III), Vanadyum (II) veya İterbiyum (III) gibi bir nükleer manyetik spin rezonans izotopu; veya rodamin veya floresin yer alır.

Manyetik rezonans görüntüleme için kontrast maddeleri kullanılır. Örnek kontrast maddeleri arasında demir, altın, gadolinyum ve galyum yer alır. Manyetik rezonans görüntüleme için uygun işaretler bu alanda bilinmekte ve bunlar arasında örneğin flor, gadolinyum şelatları, metaller ve metal oksitler, örneğin demir, galyum, altın, gadolinyum, magnezyum, ^{1}H, ^{19}F, ^{13}C ve $^{1}5N$ ile işaretlenmiş bileşikler yer alır. Kontrast maddelerinde şelatların kullanımı bu alanda bilinmektedir. Tomografik görüntüleme usulleri için uygun işaretler bu alanda bilinmekte ve bunlar arasında örneğin ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O veya ^{64}Cu gibi β yayıcılar veya (b) γ yayıcılar, örneğin 1231 yer alır. Örneğin PET için izleyiciler olarak kullanılabilen diğer örnek radyonüklitler arasında ^{55}Co, ^{67}Ga, ^{68}Ga, $^{60}Cu(II)$, $^{67}Cu(II)$, ^{99}Tc, ^{57}Ni, ^{52}Fe ve ^{18}F yer alır. Antikor veya HABP uygun bir işarete konjuge edilebilir ve/veya protein oluşturucu moleküllerinde bir radyoaktif işaret içerebilir.

Burada sunulan görüntüleme usulleri için uygun nüklitlerin örnek bir listesi örneğin ^{11}Karbon, ^{11}Flor, ^{13}Karbon, ^{13}Azot, ^{15}Azot, ^{15}Oksijen, ^{18}Flor, ^{19}Flor , ^{24}Sodyum, ^{32}Fosfat, ^{42}Potasyum, ^{51}Krom, ^{55}Demir, ^{59}Demir, ^{57}Kobalt, ^{60}Kobalt, ^{64}Bakır, ^{67}Galyum, ^{68}Galyum, ^{75}Selenyum, ^{81}Kripton, ^{82}Rubidyum, ^{89}Stronsiyum, ^{92}Stronsiyum, ^{90}İtriyum, ^{99}Teknetyum, ^{103}Paladyum, ^{106}Rutenyum, ^{111}İndiyum, ^{117}Lutesyum, ^{123}İyot, ^{125}İyot, ^{131}İyot, ^{133}Ksenon, ^{137}Sezyum, ^{153}Samaryum, ^{153}Gadolinyum, ^{165}Disprosyum, ^{166}Holmiyum, ^{169}İterbiyum, ^{177}Leutyum, ^{196}Renyum, ^{188}Renyum, ^{192}İridyum, ^{198}Altın, ^{201}Talyum, ^{211}Astatin, ^{212}Bizmut ve ^{213}Bizmutu içerir. Bu alanda uzman olanlar, farklı nüklitleri/metalleri görselleştirmek için farklı görüntüleme usullerinde (örneğin MRI) kullanılan parametreleri değiştirebilirler.

Floresan işaretler de kullanılabilir. Bunlar arasında floresan proteinler, floresan problar veya floresan substrat yer alır. Örneğin, floresan proteinler arasında sınırlandırıcı olmamak yeşil floresan protein (GFP) veya bunun homologları veya RFP gibi floresan proteinler; floresan boyalar (örneğin floresin ve bunun türevleri, örneğin floresin izotionat (FITC) ve Oregon Green®, rodamin ve türevleri (örneğin Teksas kırmızısı ve tetrametil rodamin izotiosiyanat (TRITC)), biyotin, fikoeritrin, AMCA, Alexa Fluor®, Li-COR®, CyDyes® veya DyLight® Fluors); tdTomato, mCherry, mPlum, Neptune, TagRFP, mKate2, TurboRFP ve TurboFP635 (Katushka) yer alır. Floresan tepkime maddesi kullanıcının

istediği eksitasyon ve emisyon spektrumları temelinde seçilebilir. Floresan yarılma ürünleriyle sonuçlanan floresan substratlar da kullanılabilir.

HA'yla ilişkili tümörlerin veya kanserlerin tanısında *in vivo* görüntüleme usulleri kullanılabilir. Böyle bir teknik, biyopsi kullanmadan tanıya yardım eder. Bir HABP'nin bir tümöre bağlanma derecesini veya seviyesini esas alan *in vivo* görüntüleme usulleri kanser hastalarının prognozları için de kullanılabilir. *İn vivo* görüntüleme usulleri, vücudun başka yerlerindeki metastatik kanserleri veya dolaşan tümör hücrelerini (CTC'ler) saptamak için de kullanılabilir. Tümörler dışındaki dokularda hiyalüronanın referans seviyelerini değerlendirmek bu alanda uzman olanların becerileri dâhilindedir. Hiyalüronan eksprese eden tümörler referans dokulardakinden daha yüksek sinyal seviyelerine sahip olacaktır. Bazı örneklerde, eşik kriterler normal veya sağlıklı deneklerde saptanan sinyalle karşılaştırılarak belirlenebilir.

b. Tedavi Öncesi Lenfosit Sayımı

Burada sunulan kombinasyon terapisi, en azından kısmen, kanserleri, özellikle orta ila yüksek HA içeriğine sahip olmakla özellik kazanan kanserleri tedavi etmek için bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinlerini bloke ederek bir bağışıklık yanıtını başlatır. Bağışıklık yanıtı aktivasyonu lenfositlere dayandığı için, burada sunulan kombinasyon terapisini alacak hastalar için seçim kriterleri arasında mutlak lenfosit sayımı (ALC) kullanılabilir. ALC ve ALC'yi belirlemek için usuller (burada sunulan kombinasyon terapilerine verilen yanıtı izlemek için) burada başka yerlerde açıklanmaktadır. Hasta olmayan bir bireydeki normal bir ALC 800/mL ila 3,500/mL aralığındadır. Sunulan kombinasyon terapisiyle tedavi için seçilen hastalar tipik olarak seçimden önce normal aralık içinde veya yaklaşık olarak normal aralık içinde ALC gösterir. Örneğin, burada sunulan kombinasyon terapisi için seçilen bir hastada ALC en az 800/mL, örneğin 800/mL, 900/mL, 1,000/mL, 1,250/mL, 1,500/mL, 2,000/mL, 2,500/mL, 3,000/mL veya 3,500/mL'dir. Özel örneklerde, burada sunulan kombinasyon terapisi için seçilen deneklerde ALC en az 1,000/mL'dir.

2. Dozaj ve Uygulama

Bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim gibi polimere konjuge edilmiş bir anti-hiyalüronan madde ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor (örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru) içeren burada sunulan kombinasyon terapisi, terapötik olarak yararlı bir etki yapmak için yeterli bir miktarda uygulanır. Tipik olarak, etken maddeler, tedavi edilmekte olan hastada

istenmeyen yan etkilere yol açmayan veya yukarıdaki maddelerin biriyle tek tedavi için gerekli olan dozajlar ve miktarlarla karşılaştırıldığında gözlemlenen yan etkileri en aza indiren veya azaltan bir miktarda uygulanır. Örneğin burada başka yerde açıklandığı gibi, burada polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorla kombinasyon terapisinin taşıyıcı veya maddelerin birinin uygulanmasıyla karşılaştırıldığında tümör ilerlemesinde azalmaya yol açtığı saptanmıştır. Dolayısıyla, burada sunulan kombinasyon terapisinde uygulanabilen bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor gibi bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün miktarının, önceki tekniğin usulleri kullanılarak uygulanan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü (örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor) miktarlarına kıyasla düşürülmesi ve esas itibayırla aynı veya daha iyi terapötik etkinliğin elde edilmesi mümkün olabilmektedir. Uygulanan dozajın azaltılabilmesi sayesinde, bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı antikor uygulamasıyla ilişkili yan etkiler, örneğin burada başka yerde açıklanan bağışıklıkla ilişkili olumsuz olaylar azalır, en aza iner veya engellenir.

Bir hastaya uygulanacak anti-hiyalüronan madde, örneğin polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü de dâhil olmak üzere etken maddelerin tam miktarlarının belirlenmesi bu alanda uzman olanların becerileri dâhilindedir. Örneğin kanserleri ve katı tümörleri tedavi etmek için bu maddeler ve kullanımlar bu alanda iyi bilinmektedir. Dolayısıyla, bu maddelerin bir bileşimdeki veya kombinasyon terapisindeki dozajları, belirli bir uygulama yolunda o madde için standart dozaj rejimleri esas alınarak seçilebilir.

Tam dozaj ve tedavi süresinin, tedavi edilmekte olan dokuya veya tümöre bağlı olduğu ve bilinen test protokolleri kullanılarak ampirik olarak veya *in vivo* veya *in vitro* test verilerinden ekstrapolasyonla belirlenebileceği ve spesifik maddenin bilinen dozaj rejimlerinden belirlenebileceği takdir edilecektir. Konsantrasyonların ve dozaj değerlerinin tedavi edilen hastanın yaşına, hastanın ağırlığına, uygulama yoluna ve/veya hastalığın derecesine veya şiddetine ve vasıflı bir tıp uygulamacısının dikkate alacağı diğer faktörlere göre değişebileceğini belirtmek gerekir. Genellikle, dozaj rejimleri toksisiteyi sınırlandıracak şekilde seçilir. Tedaviyi uygulayan doktorun, toksisite, veya kemik iliği, karaciğer veya böbrek veya başka doku disfonksiyonları nedeniyle terapinin nasıl ve ne zaman sonlandırılacığını, kesintiye uğratılabileceğini veya düşük dozaja ayarlanabileceğini

bileceğini belirtmek gerekir. Buna karşılık tedaviyi uygulayan doktor, klinik yanıt yeterli değilse tedaviyi yüksek seviyelere nasıl ve ne zaman ayarlayacağını da (toksik yan etkileri önleyerek) bilecektir. Herhangi bir spesifik hasta için, spesifik dozaj rejimlerinin bireysel ihtiyaca ve formülasyonları uygulayan veya uygulanmasını denetleyen kişinin mesleki yargısına göre zaman içinde ayarlanmasının gerekli olduğu ve burada verilen konsantrasyon aralıklarının sadece örnek olduğu ve sınırlandırıcı olmasının amaçlanmadığı da takdir edilecektir.

Örneğin bir hiyalüronidaz, örneğin bir PH20 (örneğin PEGPH20) gibi polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, tümörle ilişkili hiyalüronanı ayrıştırmak veya yarmak için terapötik olarak etkili bir miktarda uyglanır. Bir hastalığın veya rahatsızlığın, örneğin HA açısından zengin bir tümör gibi bir kanserin veya katı tümörün tedavisi için uygulanacak bir çözünür hiyalüronidaz gibi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin miktarı, standart klinik tekniklerle belirlenebilir. Ayrıca, optimal dozaj aralıklarının belirlenmesine yardım etmek için *in vitro* tahliller ve hayvan modelleri kullanılabilir. Ampirik olarak belirlenebilen tam dozaj spesifik enzime, uygulama yoluna, tedavi edilecek hastalığın tipine ve hastalığın ciddiyetine bağlıdır. Örnek dozaj aralığı yaklaşık veya Birim ila 50,000,000 Birim veya yaklaşık bu aralıkta bir polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim veya bir polimere konjuge edilmiş başka bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin işlevsel olarak eşdeğer bir miktarıdır. Bir aktivite biriminin standart bir aktiviteye, örnneğin hiyalüronidaz aktivitesini tahlil eden bir mikrotürbidite tahlilinde ölçülen bir aktiviteye normalize edildiği takdir edilecektir.

Dolayısıyla polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PH20 gibi bir hiyalüronidaz, örneğin bir PEG eya 10 ila 50,000,000 Birim, 10 ila 40,000,000 Birim, 10 ila 36,000,000 Birim, 10 ila 12,000,000 Birim, 10 ila 1,200,000 Birim, 10 ila 1,000,000 Birim, 10 ila 500,000 Birim, 100 ila 100,000 Birim, 500 ila 50,000 Birim, 1000 ila 10,000 Birim, 5000 ila 7500 Birim, 5000 Birim ila 50,000 Birim veya 1,000 ila 10,000 Birim aralığında veya yaklaşık bu aralıkta uygulanabilir. Genellikle, polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bir hastaya 0.01 µg/kg ila 25 mg/kg, örneğin 0.0005 mg/kg (0.5 µg/kg) ila 25 mg/kg, 0.5 µg /kg ila 10 mg/kg, 0.02 mg/kg ila 1.5 mg/kg, 0.01 µg/kg ila 15 µg/kg, 0.05 µg/kg ila 10 µg/kg, 0.75 µg/kg ila 7.5 µg/kg veya 1.0 µg/kg ila 3.0 µg/kg aralığındaki veya yaklaşık bu aralıktaki bir miktarda uygulanır. Örneğin dozaj aralığı miktarı 0.01 µg/kg ila 100 µg/kg (hastanın), 0.01 µg/kg ila 50 µg/kg, 0.01 µg/kg ila 15 µg/kg, 0.05 µg/kg ila 10 µg/kg, 0.75 µg/kg ila 7.5 µg/kg, 1.0 µg/kg ila 5.0 veya 1.0

µg/kg ila 3.0 µg/kg aralığında veya yaklaşık bu aralıkta olabilir. Polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim örneğin en az veya yaklaşık en az 0.00001 mg/kg hasta (0.01 µg/kg) dozajında uygulanabilir, örneğin tipik olarak yaklaşık 70 kg ila 75 kg ağırlığında olan ortalama bir erişkin insana 0.0005 mg/kg, 0.0006 mg/kg, 0.0007 mg/kg, 0.0008 mg/kg, 0.0009 mg/kg, 0.001 mg/kg, 0.0016 mg/kg, 0.002 mg/kg, 0.003 mg/kg, 0.004 mg/kg, 0.005 mg/kg, 0.006 mg/kg, 0.007 mg/kg, 0.008 mg/kg, 0.009 mg/kg, 0.01 mg/kg, 0.016 mg/kg, 0.02 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.04 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.06 mg/kg, 0.07 mg/kg, 0.08 mg/kg, 0.09 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.15 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.30 mg/kg, 0.35 mg/kg, 0.40 mg/kg, 0.45 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.55 mg.kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.6 mg/kg, 1.7 mg/kg, 1.8 mg/kg, 1.9 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 3.5 mg/kg, 4 mg/kg, 4.5 mg/kg, 5 mg/kg, 5.5 mg/kg, 6 mg/kg, 6.5 mg/kg, 7 mg/kg, 7.5 mg/kg, 8 mg/kg, 8.5 mg/kg, 9 mg/kg, 9.5 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23 mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg veya daha yüksek bir dozajda uygulanabilir.

Burada sunulan PEGillenmiş bir hiyalüronidaz (örneğin PEGPH20) gibi polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, 0.5 Birim/kg'den yüksek bir miktarda, örneğin, 1 Birim/kg ila 800,000 Birim/kg aralığındaki veya yaklaşık bu aralıktaki bir miktarda, örneğin 10 ila 800,000 Birim/kg, 10 ila 750,000 Birim/kg, 10 ila 700,000 Birim/kg, 10 ila 650,000 Birim/kg, 10 ila 600,000 Birim/kg, 10 ila 550,000 Birim/kg, 10 ila 500,000 Birim/kg, 10 ila 450,000 Birim/kg, 10 ila 400,000 Birim/kg, 10 ila 350,000 Birim/kg, 10 ila 320,000 Birim/kg, 10 ila 300,000 Birim/kg, 10 ila 280,000 Birim/kg, 10 ila 260,000 Birim/kg, 10 ila 240,000 Birim/kg, 10 ila 220,000 Birim/kg, 10 ila 200,000 Birim/kg, 10 ila 180,000 Birim/kg, 10 ila 160,000 Birim/kg, 10 ila 140,000 Birim/kg, 10 ila 120,000 Birim/kg, 10 ila 100,000 Birim/kg, 10 ila 80,000 Birim/kg, 10 ila 70,000 Birim/kg, 10 ila 60,000 Birim/kg, 10 ila 50,000 Birim/kg, 10 ila 40,000 Birim/kg, 10 ila 30,000 Birim/kg, 10 ila 20,000 Birim/kg, 10 ila 15,000 Birim/kg, 10 ila 12,800 Birim/kg, 10 ila 10,000 Birim/kg, 10 ila 9,000 Birim/kg, 10 ila 8,000 Birim/kg, 10 ila 7,000 Birim/kg, 10 ila 6,000 Birim/kg, 10 ila 5,000 Birim/kg, 10 ila 4,000 Birim/kg, 10 ila 3,000 Birim/kg, 10 ila 2,000 Birim/kg, 10 ila 1,000 Birim/kg, 10 ila 900 Birim/kg, 10 ila 800 Birim/kg, 10 ila 700 Birim/kg, 10 ila 500 Birim/kg, 10 ila 400 Birim/kg, 10 ila 300 Birim/kg, 10 ila 200 Birim/kg, 10 ila 100 Birim/kg, 16 ila 600,000 Birim/kg, 16 ila 500,000 Birim/kg, 16 ila 400,000 Birim/kg, 16 ila 350,000 Birim/kg, 16 ila 320,000 Birim/kg, 16 ila 160,000

Birim/kg, 16 ila 80,000 Birim/kg, 16 ila 40,000 Birim/kg, 16 ila 20,000 Birim/kg, 16 ila 16,000 Birim/kg, 16 ila 12,800 Birim/kg, 16 ila 10,000 Birim/kg, 16 ila 5,000 Birim/kg, 16 ila 4,000 Birim/kg, 16 ila 3,000 Birim/kg, 16 ila 2,000 Birim/kg, 16 ila 1,000 Birim/kg, 16 ila 900 Birim/kg, 16 ila 800 Birim/kg, 16 ila 700 Birim/kg, 16 ila 500 Birim/kg, 16 ila 400 Birim/kg, 16 ila 300 Birim/kg, 16 ila 200 Birim/kg, 16 ila 100 Birim/kg, 160 ila 12,800 Birim/kg, 160 ila 8,000 Birim/kg, 160 ila 6,000 Birim/kg, 160 ila 4,000 Birim/kg, 160 ila 2,000 Birim/kg, 160 ila 1,000 Birim/kg, 160 ila 500 Birim/kg, 500 ila 5000 Birim/kg, 1000 ila 100,000 Birim/kg veya 1000 ila 10,000 Birim/kg uygulama yapılan hastanın kütlesi miktarında uygulanır. Bazı örneklerde, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronidaz (örneğin PEGPH20) gibi polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, 0.5 Birim/kg ila 4,000 Birim/kg, 1 Unit/kg ila 1000 Birim/kg, 1 Birim/kg ila 500 Birim/kg. 5 Birim/kg ila 500 Birim/kg, 10 Birim/kg ila 500 Birim/kg, 20 Birim/kg ila 400 Birim/kg veya 10 Birim/kg ila 50 Birim/kg aralığında veya yaklaşık bu aralıkta uygulanabilir.

Genellikle, PEGillenmiş hiyalüronidazın spesifik aktivitesi 10,000 U/mg ila 80,000 U/mg, örneğin 20,000 U/mg ila 60,000 U/mg veya 18,000 U/mg ila 45,000 U/mg aralığında veya yaklaşık bu aralıktadır, genellikle en az veya en az yaklaşık 1 Birim/kg (U/kg), 2 U/kg, 3 U/kg, 4 U/kg, 5 U/kg, 6 U/kg, 7 U/kg, 8 U/kg, 8 U/kg 10 U/kg, 16 U/kg, 32 U/kg, 64 U/kg, 100 U/kg, 200 U/kg, 300 U/kg, 400 U/kg, 500 U/kg, 600 U/kg, 700 U/kg, 800 U/kg, 900 U/kg, 1,000 U/kg, 2,000 U/kg, 3,000 U/kg, 4,000 U/kg, 5,000 U/kg, 6,000 U/kg, 7,000 U/kg, 8,000 U/kg, 9,000 U/kg, 10,000 U/kg, 12,800 U/kg, 20,000 U/kg, 32,000 U/kg, 40,000 U/kg, 50,000 U/kg, 60,000 U/kg, 70,000 U/kg, 80,000 U/kg, 90,000 U/kg, 100,000 U/kg, 120,000 U/kg, 140,000 U/kg, 160,000 U/kg, 180,000 U/kg, 200,000 U/kg, 220,000 U/kg, 240,000 U/kg, 260,000 U/kg, 280,000 U/kg, 300,000 U/kg, 320,000 U/kg, 350,000 U/kg, 400,000 U/kg, 450,000 U/kg, 500,000 U/kg, 550,000 U/kg, 600,000 U/kg, 650,000 U/kg, 700,000 U/kg, 750,000 U/kg, 800,000 U/kg hastanın kütlesi veya daha yüksek bir miktarda uygulanır. Örneğin en az 1,000 Birim (U); 2000 U; 3,000 U; 4,000 U; 5,000 U; 6,000 U; 7,000 U; 8,000 U; 9,000 U; 10,000 U; 20,000 U; 30,000 U; 40,000 U; 50,000 U; 60,000 U; 70,000 U; 80,000 U; 90,000 U; 100,000 U; 200,000 U; 300,000 U; 400,000 U; 500,000 U; 600,000 U; 700,000 U; 800,000 U; 900,000 U; 1,000,000 U; 1,500,000 U; 2,000,000 U; 2,500,000 U; 3,000,000 U; 3,500,000 U; 4,000,000 U veya daha fazla bir miktar uygulanır.

Buradaki örneklerde, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor spesifik dozaj rejimi için terapötik olarak etkili bir miktarda temin edilir. Terapötik olarak etkili konsantrasyonlar, burada sunulan tahliller gibi, bilinen *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde bileşikler test edilerek ampirik olarak belirlenebilir. Seçilmiş bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün bileşimdeki konsantrasyonu, kompleksin emilim, inaktivasyon ve atılım hızları, kompleksin fizikokimyasal özellikleri, dozaj programı ve uygulanan miktarın yanı sıra bu alanda uzman olanların bildiği başka faktörlere bağlıdır.

Örneğin, tam dozajın ve tedavi süresinin tedavi edilmekte olan kanserin tipine bağlı olduğu ve bilinen test protokolleri kullanılarak ampirik olarak veya *in vivo* veya *in vitro* test verilerinden ekstrapolasyonla belirlenebileceği takdir edilecektir. Konsantrasyonların ve dozaj değerlerinin tedavi edilen hastanın yaşına göre de değişebileceğini belirtmek gerekir. Ayrıca herhangi bir spesifik hasta için, spesifik dozaj rejimlerinin zaman içinde bireysel ihtiyaçlara ve formülasyonları uygulayan veya uygulamayı denetleyen kişinin mesleki yargısına göre ayarlanması gerektiği ve burada verilen konsantrasyon aralıklarının sadece örnek olduğu ve çerçeveyi sınırlandırmaya yönelik olmadığı da takdir edilecektir.

Kanserlerin tedavisi için uygulanacak seçilmiş bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün miktarı standart klinik tekniklerle veya burada açıklanan başka usullerle belirlenebilir. Ayrıca, optimal dozaj aralıklarının belirlenmesine yardım etmek için *in vitro* tahliller ve hayvan modelleri kullanılabilir. Dolayısıyla, ampirik olarak belirlenebilen tam dozaj, spesifik immünoglobülin terkibine, çözünür hiyalüronidazla uygulanan rejime ve dozaj programına, uygulama yoluna, tedavi edilecek kanser tipine ve hastalığın ilerlemesine bağlı olabilir. Kanserleri tedavi etmek için bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü formülasyonlarının örnek dozaj rejimleri (dozlar ve sıklıklar) aşağıda verilmektedir. Diğer dozaj rejimleri bu alanda uzman olanlar tarafından iyi bilinmektedir. Gerekirse, spesifik bir dozaj ve süre ve tedavi protokolü ampirik olarak veya ekstrapolasyonla belirlenebilir.

Bazı örneklerde, bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün dozu bağışıklık sistemi hücre popülasyonlarının bir fonksiyonudur. Örneğin, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün dozu, uygulanan maddeye yanıt olarak T_{reg} hücrelerinin sayısındaki artışı en aza indirmek için modüle edilebilir. Örneğin, bir maksimum doz, dolaşan T_{reg} hücrelerinin sayısında bir artışa yol açmayan maksimum doz olarak belirlenebilir. Başka

bir örnekte, bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün dozu, tümörü olan hastada efektör hücrelerin sayısındaki artışı en yükseğe çıkarmak için modüle edilebilir. Başka bir örnekte, bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün dozu, T_{reg} hücrelerinin sayısındaki artışı en aza indirmek veya önlemek ve arttırmak, ama efektör hücrelerin sayısındaki artışı en yükseğe çıkarmak üzere seçilir. Bu dozları belirlemek için usuller bu alanda bilinmekte ve burada açıklanmaktadır. Örneğin T_{reg} hücrelerinin ve/veya efektör hücrelerin sayısı/sayıları bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün uygulanmasından sonra bir veya daha fazla farklı zaman noktasında akış sitometrisiyle (burada yukarıda açıklanmaktadır) ölçülebilir. Örneğin T_{reg} hücrelerinin ve/veya efektör hücrelerin sayısı/sayıları, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün uygulandığı gün ve/veya uygulamadan 1 gün, 2 gün, 3 ün, 4 gün, 5 gün, 6 gün, 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta, 4 hafta, 5 hafta, 6 hafta, 7 hafta, 8 hafta, 9 hafta, 10 hafta, 11 hafta, 12 hafta veya daha uzun bir süre sonra, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün uygulanmasından 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün veya 1 hafta sonra belirlenebilir. Sonraki doz saptanan T_{reg} hücreleri ve/veya efektör hücrelerin seviyelerine ilişkin olarak istenen etkilere ulaşmak için modüle edilebilir.

Bazı örneklerde, intravenöz yolla uygulanan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikorun örnek dozları, uygun dozajları belirlemek için bir başlangıç noktası olarak kullanılabilir. Dozaj seviyeleri, hastanın vücut ağırlığı, genel sağlığı, yaşı, kullanılan spesifik bileşiğin aktivitesi, cinsiyet, beslenme düzeni, uygulama zamanı, atılım hızı, ilaç kombinasyonu, hastalığın şiddeti ve seyri ve hastanın hastalığa yatkınlığı ve tedaviyi uygulayan doktorun yargısı gibi çeşitli faktörler temelinde belirlenebilir. Sunulan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörlerinin sınırlandırıcı olmayan örnek dozajları bir kg vücut ağırlığı için 0.1 mg (mg/kg BW) ila yaklaşık 50 mg/kg BW aralığında yaklaşık bu aralıkta, örneğin yaklaşık 0.1 mg/kg ila yaklaşık 20 mg/kg BW, yaklaşık 0.1 ila yaklaşık 10 mg/kg BW, yaklaşık 0.3 ila yaklaşık 10 mg/kg, yaklaşık 0.5 mg/kg ila 5 mg/kg veya 0.5 mg/kg ila 1 mg/kg'dir. Örneğin, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, tümörü olan hayvanlara örneğin en az yaklaşık 0.1 mg/kg, 0.15 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.30 mg/kg, 0.35 mg/kg, 0.40 mg/kg, 0.45 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.55 mg.kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.6 mg/kg, 1.7 mg/kg, 1.8 mg/kg, 1.9 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 3.5 mg/kg, 4 mg/kg, 4.5 mg/kg, 5 mg/kg, 5.5 mg/kg, 6 mg/kg, 6.5 mg/kg, 7 mg/kg, 7.5 mg/kg, 8 mg/kg, 8.5 mg/kg,

9 mg/kg, 9.5 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23 mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg dozlarında veya daha yüksek dozlarda uygulanabilir. Özellikle, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü en az 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3, mg/kg, 5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg veya 15 mg/kg dozunda uygulanır. Bazı örneklerde, örnek dozajlar arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla yaklaşık veya 0.01 mg/m^2 ila yaklaşık veya 500 mg/m^2, örneğin yaklaşık veya 0.01 mg/m^2, yaklaşık veya 0.1 mg/m^2, yaklaşık veya 0.5 mg/m^2, yaklaşık veya 1 mg/m^2, yaklaşık veya 5 mg/m^2, yaklaşık veya 10 mg/m^2, yaklaşık veya 15 mg/m^2, yaklaşık veya 20 mg/m^2, yaklaşık veya 25 mg/m^2, yaklaşık veya 30 mg/m^2, yaklaşık veya 35 mg/m^2, yaklaşık veya 40 mg/m^2, yaklaşık veya 45 mg/m^2, yaklaşık veya 50 mg/m^2, yaklaşık veya 100 mg/m^2, yaklaşık veya 150 mg/m^2, yaklaşık veya 200 mg/m^2, yaklaşık veya 250 mg/m^2, yaklaşık veya 300 mg/m^2, yaklaşık veya 400 mg/ m^2, yaklaşık veya 500 mg/ m^2 dozajları yer alır. Bu alanda uzman olanların mg/kg ve mg/m^2 birimlerini tanıyabildiği ve bunları birbirlerine dönüştürebildiği takdir edilecektir (örneğin bakınız: Michael J. Derelanko, TOXICOLOGIST'S POCKET HANDBOOK, CRC Press, sayfa 16 (2000)).

Uygulanacak miktarın tedavi edilmekte olan kanser tipi, uygulama yolu ve muhtemel yan etkilerin tolere edilebilirliğine bağlı olduğu takdir edilecektir. Gerekliyse, dozaj ampirik olarak belirlenebilir. Bu dozajlara ulaşmak için, subkütanöz olarak uygulanan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü içeren formülasyonların hacimleri yaklaşık veya 1 mL ila 700 mL, örneğin 10 mL ila 500 mL, örneğin 100 mL ila 400 mL olabilir. Örneğin subkütanöz olarak uygulanan bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü içeren formülasyonların hacimleri tek dozaj uygulaması için en az veya yaklaşık en az 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL olabilir.

Başka örneklerde, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün dozu düşük bir doz, örneğin uygulama başına 1 m'den az veya buna eşit, örneğin uygulama başına 500 µg, 400 µg, 300 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg, 30 µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg veya 1 µg'den az veya buna eşit olabilir. Bu düşük dozların zaman içinde hastaya tekrar tekrar, örneğin günde iki kez, günde bir kez, iki günde bir, haftada iki, hafta bir, ayda iki kez, ayda bir kez ve bu şekilde uygun bir hacimde uygulanabileceği takdir edilecektir.

Burada sunulan hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü formülasyonları intravenöz, subkütanöz, intratümöral, intradermal, ağızdan veya başka uygulama yollarıyla uygulanabilir. Uygulanan maddeler için spesifik yol farklı veya aynı olabilir. Örneğin bir veya daha fazla madde veya maddelerin hepsi intravenöz yolla uygulanabilir. Bazı örneklerde, burada polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin intravenöz yolla ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün intravenöz yolla uygulanması düşünülmektedir.

İntravenöz uygulama için, maddelerin biri veya daha fazlası veya hepsi puşe veya bolusla, infüzyonla veya bunların bir kombinasyonuyla uygulanabilir. İnfüzyon süresi yaklaşık 1 dakika ila üç saat, örneğin yaklaşık 1 dakika ila yaklaşık iki saat veya yaklaşık 1 dakika ila yaklaşık 60 dakika ve genellikle en az 10 dakika, 40 dakika veya 60 dakika olabilir. Maddeler eş zamanlı infüzyon veya müteakip infüzyonla uygulanabilir. Örneğin uygulanan maddeler, ayrı ayrı uygulanır ve ayrı infüzyonlar için ayrı torbalarda temin edilir. Özel örneklerde, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim bileşimi ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitör bileşimi ayrı ayrı formüle edilir ve uygulanır.

3. Dozaj Rejimi: Uygulama Sıklığı ve Döngüsü

Anti-hiyalüronan madde, örneğin polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitöründen önce, onunla eş zamanlı olarak veya hemen hemen eş zamanlı olarak, art arda veya aralıklı bir şekilde uygulanabilir, Örneğin hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin PEGPH20 ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası proteinine karşı bir antikor (örneğin bir anti-CTLA4 veya anti-PD-1 antikoru) birlikte veya ayrı ayrı uygulanabilir.

Genel olarak bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim gibi anti-hiyalüronan madde bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitöründen önce uygulanır. Örneğin, polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün uygulanmasından en fazla 48 saat önce uygulanır. Örneğin, anti-hiyalüronan madde veya hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün uygulanmasından en az veya en az yaklaşık veya yaklaşık veya 5 dakika, 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat, 12 saat, 16 saat, 18 saat, 20 saat, 22 saat, 24 saat, 30 saat, 36 saat, 40 saat, en fazla 48 saat önce uygulanır.

Uygulama sıklığı ve zamanı ve dozaj miktarları, etken maddelerin istenen bir süre için sürekli ve/veya uzun dönemli bir etkisini korumak için bir uygulama döngüsü boyunca

peridoyik olarak uygulanabilir ve hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü için aynı olması gerekmez. Sunulan kombinasyonlar veya bileşimler saatlik, günlük, haftalık, aylık, yıllık olarak veya bir kez uygulanabilir. Uygulama döngüsünün süresi ampirik olarak belirlenebilir ve tedavi edilen hastalık, hastalığın şiddeti, spesifik hasta ve tedaviyi uygulayan doktorun beceri seviyesi dâhilindeki başka faktörlere bağlıdır. Burada sunulan bir kombinasyon terapisiyle tedavinin süresi bir hafta, iki hafta, bir ay, birkaç ay, bir yıl, birkaç yıl veya daha fazla olabilir.

Örneğin hiyalüronan ayrıştırıcı enzimi uygulama sıklığı günde bir kez, iki günde bir, iki haftada bir, haftada bir, 2 haftada bir, 3 haftada bir veya 4 haftada birdir. Dozajlar tedavi sırasında birçok uygulama döngüsüne bölünebilir. Örneğin, bir hiyalüronidaz enzimi yaklaşık bir ay, 2 ay, 3 ay, 4 ay, 5 ay, 6 ay, bir yıl veya daha uzun bir süre belirtilen sıklıkta uygulanabilir. Uygulama sıklığı döngü boyunca aynı veya farklı olabilir. Örneğin bir örnek dozaj sıklığı, en azından bir uygulama döngüsünün ilk haftası için haftada iki kezdir. İlk haftadan sonra, sıklık haftada iki kez olarak devam edebilir, haftada iki kezin üzerine çıkabilir veya haftada en fazla bir keze düşürülebilir. Uygulanan spesifik dozaj, tedavi edilmekte olan hastalık, hastalığın veya rahatsızlığın şiddeti, hastanın yaşı ve buna benzer başka faktörler temelinde spesifik dozaj sıklığını ve uygulama döngüsünü belirlemek bu alanda uzman olanların becerileri dâhilindedir.

Bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü aynı sıklıkta veya farklı bir sıklıkta uygulanabilir, ama bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün her uygulamasından en fazla 48 saat önce bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulaması yapılır. Örneğin bazı örneklerde, her hiyalüronan ayrıştırıcı enzim dozunu 24 ila 48 saat sonra bir bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü dozu izler. Özel örneklerde, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü hiyalüronan ayrıştırıcı enzimden daha seyrek uygulanır, ama her bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü dozundan önce bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim dozu uygulanır. Örneğin bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü haftada iki kez, haftada bir kez, 2 haftada bir, 3 haftada bir, 4 haftada bir, 6 haftada bir, 2 ayda bir, 3 ayda bir, 4 ayda bir, 5 ayda bir veya 6 ayda bir ve öncesinde bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulaması olacak şekilde uygulanır. Bu örneklerde, bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitöründan önceki hiyalüronan ayrıştırıcı enzim dozu, hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin dozaj programıyla uyumludur. Genellikle bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü en fazla ayda bir kez, örneğin üç haftada bir veya dört haftada bir uygulanır.

Tedavi kesilmeden semptomlar devam ederse, tedavi ek bir süre daha sürdürülebilir. Tedavi sırasında, hastalığın ve/veya tedaviyle ilişkili toksisite veya yan etkilerin kanıtları izlenebilir.

Hiyalüronan ayrıştırıcı enzim ve/veya bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörünün uygulama döngüsü, maddelere maruziyetten bir dinlenme dönemi sağlamak için tedavinin durdurulduğu dönemler ilave etmek için ayarlanabilir. Tedavinin durdurulduğu süre önceden belirlenmiş bir süre olabilir veya hastanın nasıl yanıt verdiğine veya gözlemlenen yan etkilere göre ampirik olarak belirlenebilir. Örneğin tedavi bir hafta, iki hafta, bir ay veya birkaç ay durdurulabilir. Genellikle tedavinin durdurulduğu dönem bir hasta için bir dozaj rejimi döngüsü içinde yer alır.

Örneğin, örnek bir dozaj rejimi 28 günlük bir tedavi döngüsü veya uygulama döngüsüdür. Madde, örneğin polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim gibi anti-hiyalüronan madde 1. gün uygulanabilir, ardından 2. gün bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü, örneğin bir bağışıklık sistemi kontrol noktası proteini antikoru uygulandıktan sonra 26 gün doz uygulaması yapılmaz. Başka bir örnekte hiyalüronan ayrıştırıcı enzim 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 ve 25. günlerde haftada iki kez uygulanabilir ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü 2. gün bir kez uygulanır. Başka bir örnekte hiyalüronan ayrıştırıcı enzim 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 ve 25. günlerde haftada iki kez uygulanır ve bağışıklık sistemi kontrol noktası inhibitörü de 2, 5, 9, 12, 16, 19, 23 ve 26. günlerde haftada iki kez uygulanır. Yukarıdaki açıklamanın sadece örnek vermeye yönelik olduğu ve yukarıdakinin değişik biçimlerinin kullanılabileceği takdir edilecektir. Ayrıca, uygulanan bütün maddelere benzer uygulama döngüleri uygulanabilir veya uygulanan her madde burada sunulan kombinasyon terapisinde kendi dozaj rejiminde kullanılabilir.

Tam uygulama döngüsünün ve dozaj programının belirlenmesi bu alanda uzman olanların becerileri dâhilindedir. Yukarıda belirtildiği gibi, uygulama döngüsünün süresi istenen herhangi bir uzunlukta olabilir. Dolayısıyla 28 günlük uygulama döngüsü herhangi bir süreyle tekrarlanabilir. Tedavi edilmekte olan hastaya özgü kişisel faktörlere ve hastalığa göre hastanın ihtiyaçlarını karşılayan bir uygulama döngüsünün ve dozaj rejiminin belirlenmesi tedaviyi uygulayan doktorun becerileri dâhilindedir.

Sunulan usuller anti-hiyalüronan maddenin uygulanmasından önce, onunla eş zamanlı olarak, onunla aralıklı olarak veya ondan sonra bir kortikosteroitin uygulanmasını da içerebilir. Uygulama döngüsü herhangi bir süre için olabilir ve tedaviyi uygulayan doktor

veya klinisyen tarafından belirlenebilir. Tipik olarak, önceden belirlenmiş hafta sayısı 3 hafta veya 4 haftadır, ama daha uzun olabilir. Uygulama döngüsü hastalık durumuna ve hastanın yanıtına bağlı olarak birçok kez tekrarlanabilir.

4. Ek Kombinasyon Tedavileri

Burada sunulan kombinasyon terapisi tek başına ve ayrıca başka terapilerle veya tedavilerle kombinasyon halinde kullanılabilir. Burada sunulan kombinasyonlar veya bileşimler başka terapötik veya farmakolojik maddeler veya tedaviler, örneğin prosedürlerle birlikte formüle edilebilir veya birlikte uygulanabilir, onlardan önce, onlarla aralıklı olarak veya onlardan sonra uygulanabilir. Örneğin bu maddeler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla başka biyolojik maddeler, kansere karşı maddeler, küçük moleküllü bileşikler, dispersiyon maddeleri, anestetikler, vazokonstriktörler ve ameliyat ve bunların kombinasyonları yer alır. Bu maddeler arasında yan etkileri iyileştirmek, azaltmak veya önlemek için bir veya daha fazla madde de yer alabilir. Bazı durumlarda, kombinasyon terapisi tedaviden önce primer tümörü elimine eden bir veya daha fazla kanser tedavisiyle kombinasyon halinde kullanılabilir. Örneğin burada sunulan kombinasyon terapisine ek olarak ek kemoterapi veya radyasyon terapisi ve bunların kombinasyonları kullanılabilir. Başka örneklerde, ameliyatla çıkarma gerekli olmayabilir. Kombine edilebilecek başka usullerin örnekleri arasında, bağışıklık sistemini zayıflatmadan tümörün veya neoplastik hücrelerin proliferasyon hızını düşüren bir bileşiğin uygulanması (örneğin tümörü baskılayan bileşiklerin uygulanmasıyla veya tümör hücresine spesifik bileşiklerin uygulanmasıyla) veya anjiyogenezi inhibe eden bir bileşiğin uygulanması yer alır. Başka bir örnekte burada sunulan kombinasyon terapisinin bir parçası olarak bir aşı uygulanabilir. Bazı örneklerde, aşı GM-CSF eksprese eden bir tümör aşısı (örneğin bakınız: Jinushi ve diğerleri, (2007) J Clin Invest 117:1902-1913) gibi sitokin eksprese eden bir tümör aşısı veya tümöre karşı bir bağışıklık yanıtını daha da desteklemek için bir tümör antijeni aşısı olabilir.

İkinci bir madde veya maddeler veya tedavi veya tedaviler terkibi bir defada uygulanabilir veya aralıklı olarak uygulanacak daha küçük birkaç doza bölünebilir. Seçilen madde/tedavi terkipleri bir tedavi süresi boyunca, örneğin birkaç saat, gün, hafta veya ay boyunca bir veya daha fazla doz halinde uygulanabilir. Bazı durumlarda sürekli uygulama yararlıdır. Tam dozaj ve uygulama seyrinin, hastalığa ve hastanın toleransına bağlı olduğu takdir

edilecektir. Genellikle, buradaki ikinci maddeler/tedaviler için dozaj rejimleri bu alanda uzman olanlar tarafından bilinmektedir.

a. Kortikosteroitler

Burada sunulan kombinasyon terapisi tek başına veya ayrıca bir veya daha fazla kortikosteroitle kombinasyon halinde kullanılabilir. Bir kortikosteroit polimere konjuge edilmiş bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin veya başka maddenin bir veya daha fazla olumsuz etkisini, özellikle bir hiyalüronidaz gibi bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin ve özellikle bir PEGPH20 gibi polimerle modifiye edilmiş bir hiyalüronidazın sistemik uygulaması sonucunda ortaya çıkabilen olumsuz kas-iskelet etkilerini iyileştirmek veya azaltmak için terapötik olarak etkili bir miktarda uygulanır. Terapötik olarak etkili bir miktar, bir veya daha fazla semptomu veya olumsuz etkiyi iyileştirmek, önlemek, elimine etmek veya azaltmak için yeterli dozajdır. Düzelmenin veya başarılı ön tedavinin göstergeleri arasında CTCAE ölçeğinde ilgili bir skorun görülmemesi veya CTCAE ölçeğindeki derecede veya şiddette bir değişiklik yer alır.

Kortikosteroitler adrenal kortekste üretilen bir steroit hormonlar sınıfını oluştururlar. Kortikosteroitler stres yanıtı, bağışıklık yanıtı ve enflamasyon, karbonhidrat metabolizması, protein katabolizması, kan elektrolit sviyeleri ve davranış regülasyonu gibi çok çeşitli fizyolojik sistemlerde rol oynar. Bunlar arasında, çok sayıda başka işlevi olan antienflamatuvar maddeler olan glukokortikoitler ve esas olarak böbrekler üzerindeki etki vasıtasıyla tuz ve su dengesini kontrol eden mineralokortikoitler yer alır.

Glukokortikoitler bir steroit hormonlar sınıfı, örneğin glukokortikoit reseptörüne bağlanan kortikosteroitlerdir. Glukokortikoitler etkilerini glukokortikoit reseptörüne bağlanarak yaparlar. Başka aktiviteler arasında, aktive olmuş glukokortikoit kompleksinin çekirdekteki antienflamatuvar proteinler ekspresyonunu arttırması ve başka transkripsiyon faktörlerinin sitosolden çekirdeğe yer değiştirmesini önleyerek sitosolde proenflamatuvar proteinlerin ekspresyonunu engellemesi yer alır.

Burada sunulan kombinasyonda veya kullanıma yönelik kombinasyonlarda genel olarak herhangi bir kortikosteroit, örneğin glukokortikoit kullanılabilir. Glukokortikoitler arasında sentetik ve sentetik olmayan glukokortikoitler yer alır. Örnek glukokortikoitler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla aldometazonlar, algestonlar, beklometazonlar (örneğin beklometazon dipropionat), betametazonlar (örneğin betametazon 17-valerat, betametazon sodyum asetat, betametazon sodyum fosfat, betametazon valerat), budezonitler,

klobetazoller (örneğin klobetazol propionat), klobetazonlar, klokortolonlar (örneğin klokortolon pivalat), kloprednoller, kortikosteronlar, kortizonlar ve hidrokortizonlar (örneğin hidrokortizon asetat), kortivazoller, deflazakortlar, dezonitler, dezoksimetazonlar, deksametazonlar (örneğin deksametazon 21-fosfat, deksametazon asetat, deksametazon sodyum fosfat), diflorazonlar (örneğin diflorazon diasetat), diflukortolonlar, difluprednatlar, enoksolonlar, fluazakortlar, flukloronitler, fludrokortizonlar (örneğin fludrokortizon asetat), flumetazonlar (örneğin flumetazon pivalat), flunizolitler, flosinolonlar (örneğin flosinolon asetonit), flosinonitler, flokortinler, flokortolonlar, florometalonlar (örneğin florometalon asetat), fluperolonlar (örneğin fluperolon asetat), fluprednidenler, fluprednizolonlar, flurandrenolitler, flutikazonlar (örneğin flutikazon propionat), formokortaller, halsinonitler, halobetazoller, halometazonlar, halopredonlar, hidrokortamatlar, hidrokortizonlar (örneğin hidrokortizon 21-bütirat, hidrokortizon aseponat, hidrokortizon asetat, hidrokortizon buteprat, hidrokortizon bütirat, hidrokortizon sipionat, hidrokortizon hemisüksinat, hidrokortizon probutat, hidrokortizon sodyum fosfat, hidrokortizon sodyum süksinat, hidrokortizon valerat), loteprednol etabonat, mazipredonlar, medrisonlar, meprednizonlar, metilprednizolonlar (metilprednizolon aseponat, metilprednizolon asetat, metilprednizolon hemisüksinat, metilprednizolon sodyum süksinat), mometazonlar (örneğin mometazon furoat), parametazonlar (örneğin parametazon asetat), prednikarbatlar, prednizolonlar (örneğin prednizolon 25-dietilaminoasetat, prednizolon sodyum fosfat, prednizolon 21-hemisüksinat, prednizolon asetat; prednizolon farnesilat, prednizolon hemisüksinat, prednizolon-21 (beta-D-glukuronit), prednizolon metasülfobenzoat, prednizolon steaglat, prednizolon tebutat, prednizolon tetrahidroftalat), prednizonlar, prednivaller, prednilidenler, rimeksolonlar, tiksokortoller, triamsinolonlar (örneğin triamsinolon asetonit, triamsinolon benetonit, triamsinolon heksasetonit, triamsinolon asetonit 21-palmitat, triamsinolon diasetat) yer alır. Bu glukokortikoitler ve bunların tuzları örneğin Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa'da ayrıntılı olarak tartışılmaktadır (16. basım 1980).

Bazı örneklerde, glukokortikoit kortizonlar, deksametazonlar, hidrokortizonlar, metilprednizolonlar, prednizolonlar ve prednizonlar arasından seçilir. Özel bir örnekte, glukokortikoit deksametazondur.

Kortikosteroit terapötik olarak etkili bir dozda temin edilir. Terapötik olarak etkili konsantrasyon bilinen *in vitro* veya *in vivo* (örneğin hayvan modeli) sistemlerinde test edilerek ampirik olarak belirlenebilir. Örneğin olumsuz etkileri düzeltmek için

uygulanacak seçilmiş bir kortikosteroit miktarı standart klinik tekniklerle belirlenebilir. Ayrıca, optimal dozaj aralıklarının belirlenmesine yardım etmek için hayvan modelleri kullanılabilir. Ampirik olarak belirlenebilen tam dozaj spesifik terapötik terkibe, rejim ve dozaj programına, uygulama yoluna ve hastalığın ciddiyetine bağlı olabilir.

Bileşimdeki seçilmiş bir terapötik maddenin konsantrasyonu emilim, inaktivasyon ve atılım hızları, fizikokimyasal özellikler, dozaj programı ve uygulanan miktarın yanı sıra bu alanda uzman olanların bildiği diğer faktörlere bağlıdır. Örneğin, tam dozaj ve tedavi süresinin hastalık veya rahatsızlık, tedavi edilmekte olan doku, hasta veya denek ve miktar ve dozaj rejimi de dâhil olmak üzere anti-hiyalüronan maddeye bağlı olduğu takdir edilecektir. Kortikosteroit dozu hastanın yaşı ve sağlığı, polimere konjuge edilmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim dozu (örneğin PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim dozu), kortikosteroidin gücü ve uygulama yoluna bağlı olarak da değişebilir. Örneğin, konsantrasyonların ve dozaj değerlerinin hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin terapötik dozu ve dozaj rejimine göre değişeceğini belirtmek gerekir. Ayrıca kortikosteroit istenen sonuçlara ulaşmak için günlük, haftalık veya aylık veya daha uzun süreler için uygulanabilir. Spesifik dozaj hacmi değişebilir ve dozaj rejimi, uygulama sıklığı ve istenen uygulama oranına bağlıdır. Konsantrasyonların ve dozaj değerlerinin tedavi edilmekte olan hastanın yaşına göre de değişebileceğini belirtmek gerekir.

Tam dozaj ve tedavi süresi bilinen test protokolleri kullanılarak ampirik olarak veya *in vivo* veya *in vitro* test verilerinden ekstrapolasyonla belirlenebilir. Ayrıca herhangi bir spesifik hasta için, spesifik dozaj rejimlerinin zaman içinde bireysel ihtiyaca ve formülasyonları uygulayan veya uygulanmasını denetleyen kişinin mesleki yargısına göre ayarlanmasının gerektiği ve burada verilen konsantrasyon aralıklarının sadece örnek olduğu ve çerçeveyi sınırlandırmayı amaçlamadığı da takdir edilecektir. Genellikle dozaj rejimleri toksisiteyi sınırlandırmak için seçilir ve burada olumsuz yan etkileri düzeltmek için seçilir. Tedaviyi uygulayan doktorun, toksisiteye veya kemik iliği, karaciğer veya böbrek veya başka doku disfonksiyonlarına bağlı olarak dozajı nasıl ve ne zaman sonlandıracağını, kesintiye uğratacağını veya daha düşük dozaja ayarlayacağını bileceğini belirtmek gerekir. Buna karşılık, tedaviyi uygulayan doktor, klinik yanıt yeterli değilse tedaviyi nasıl ve ne zaman daha yüksek seviyelere ayarlayacağını da (toksik yan etkileri önleyerek) bilecektir. Bir terapötik maddenin uygulaması, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından belirlenen veya Physician's Desk Reference'ta yayımlanmış maksimum dozaj seviyelerini aşmamalıdır.

Genellikle, uygulanan kortikosteroit dozu, farklı kortikosteroitlerin güçleri farklı olduğu için spesifik kortikosteroide bağlıdır (aşağıdaki Tablo 10'a bakınız). Kortikosteroit veya glukokortikoit, örneğin deksametazon ağızdan (tabletler, sıvı veya sıvı konsantrat) PO, intravenöz (IV) veya intramüsküler yolla uygulanabilir. Kortikosteroit tipik olarak bir bolus olarak uygulanır, ama doz anti-hiyalüronan maddenin, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronidazın uygulanmasıyla ilişkili bir veya daha fazla yan etkiyi düzeltmek için etkili olduğu sürece, bir süre uygulanabilir.

Tablo 10. Glukokortikoit uygulaması

Glukokortikoit (yol)	**Eşdeğer Güç (mg)**
Hidrokortizon (IV veya PO)	20
Prednizon	5
Prednizolon (IV veya PO)	5
Metilprednizolon sodyum süksinat (IV)	4
Deksametazon (IV veya PO)	0.5-0.75

Kortikosteroit hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin uygulanmasıyla ilişkili bir veya daha fazla yan etkiyi düzeltmek için etkili olan herhangi bir miktarda uygulanabilir. Dolayısıyla kortikosteroit, örneğin glukokortikoit örneğin 70 kg ağırlığında erişkin bir insana doz başına 0.1 ve 100 mgs, 0.1 ila 80 mgs, 0.1 ila 60 mgs, 0.1 ila 40 mgs, 0.1 ila 30 mgs, 0.1 ila 20 mgs, 0.1 ila 15 mgs, 0.1 ila 10 mgs, 0.1 ila 5 mgs, 0.2 ila 40 mgs, 0.2 ila 30 mgs, 0.2 ila 20 mgs, 0.2 ila 15 mgs, 0.2 ila 10 mgs, 0.2 ila 5 mgs, 0.4 ila 40 mgs, 0.4 ila 30 mgs, 0.4 ila 20 mgs, 0.4 ila 15 mgs, 0.4 ila 10 mgs, 0.4 ila 5 mgs, 0.4 ila 4 mgs, 1 ila 20 mgs, 1 ila 15 mgs veya 1 ila 10 mgs aralığında veya yaklaşık bu aralıktaki bir miktarda uygulanabilir. Tipik olarak kortikosteroit, örneğin bir glukokortikoit ortalama bir erişkin insana doz başına 0.4 ila 20 mgs aralığındaki veya yaklaşık bu aralıktaki bir miktarda, örneğin 0.4 mgs, 0.5 mgs, 0.6 mgs, 0.7 mgs, 0.75 mgs, 0.8 mgs, 0.9 mgs, 1 mg, 2 mgs, 3 mgs, 4 mgs, 5 mgs, 6 mgs, 7 mgs, 8 mgs, 9 mgs, 10 mgs, 11 mgs, 12 mgs, 13 mgs, 14 mgs, 15 mgs, 16 mgs, 17 mgs, 18 mgs, 19 mgs veya 20 mgs miktarında veya yaklaşık bu miktarda uygulanır.

Kortikosteroit örneğin tipik olarak yaklaşık 70 kg ila 75 kg ağırlığında olan ortalama bir erişkin insana 0.001 mg/kg (hastanın ağırlığı), 0.002 mg/kg, 0.003 mg/kg, 0.004 mg/kg,

0.005 mg/kg, 0.006 mg/kg, 0.007 mg/kg, 0.008 mg/kg, 0.009 mg/kg, 0.01 mg/kg, 0.015 mg/kg, 0.02 mg/kg, 0.025 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.035 mg/kg, 0.04 mg/kg, 0.045 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.055 mg/kg, 0.06 mg/kg, 0.065 mg/kg, 0.07 mg/kg, 0.075 mg/kg, 0.08 mg/kg, 0.085 mg/kg, 0.09 mg/kg, 0.095 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.15 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.30 mg/kg, 0.35 mg/kg, 0.40 mg/kg, 0.45 mg/kg, 0.50 mg/kg, 0.55 mg/kg, 0.60 mg/kg, 0.65 mg/kg, 0.70 mg/kg, 0.75 mg/kg, 0.80 mg/kg, 0.85 mg/kg, 0.90 mg/kg, 0.95 mg/kg, 1 mg/kg, 1.05 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.15 mg/kg, 1.20 mg/kg, 1.25 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.35 mg/kg veya 1.4 mg/kg dozajında veya yaklaşık bu dozajda uygulanabilir.

Kortikosteroit uygulaması hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasıyla ilişkili bir veya daha fazla olumsuz yan etkiyi düzeltebildiği sürece uygulanan dozaj değiştirilebilir. Bir örnekte, glukokortikoit, örneğin deksametazon dozajı tedavi döngüsü başına ardışık olarak daha düşük dozajlarda uygulanır. Dolayısıyla, bu tür tedavi rejimlerinde, kortikosteroit dozu giderek azaltılır. Örneğin deksametazon, bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin uygulanmasından önce, 4 mg başlangıç dozunda uygulanır ve her ardışık hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından sonra deksametazon dozu, sonraki hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin PEGillenmiş hiyalüronidaz uygulaması için doz 3 mg olacak şekilde azaltılır, daha sonra bir anti-hiyalüronan madde, örneğin PEGillenmiş hiyalüronidaz uygulaması için 2 mg ve sonra bir anti-hiyalüronan madde, örneğin PEGillenmiş hiyalüronidaz uygulaması için 1 mg olur. Kortikosteroit dozu, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronidaz uygulamasıyla ilişkili bir veya daha fazla yan etkiyi azaltmak için etkili olduğu sürece herhangi bir doz düşünülmektedir.

Kortikosteroit uygulaması bir PEGillenmiş hiyalüronidaz gibi hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasıyla ilişkili bir veya daha fazla olumsuz yan etkiyi düzelttiği sürece uygulama zamanı değişebilir. Kortikosteroit hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimle ardışık olarak, aralıklı olarak, aynı zamanda veya aynı bileşim içinde uygulanabilir. Örneğin kortikosteroit hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin PEGillenmiş hiyalüronidaz uygulamasının öncesinde, sırasında, onunla eş zamanlı olarak veya ondan sonra uygulanabilir. Başka bir örnekte, kortikosteroit ve hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin PEGillenmiş hiyalüronidaz aralıklı olarak uygulanır. Genellikle, kortikosteroit hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin PEGylated hiyalüronidaz uygulamasından önce uygulanır. Kortikosteroit, örneğin deksametazon gibi bir glukokortikoit, anti-hiyalüronan madde, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından 0.5 dakika, 1 dakika, 2 dakika, 3 dakika, 4 dakika, 5 dakika, 6

dakika, 7 dakika, 8 dakika, 9 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 20 dakika, 25 dakika, 30 dakika, 45 dakika, 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat, 5 saat, 6 saat, 7 saat, 8 saat, 9 saat, 10 saat, 11 saat, 12 saat, 18 saat, 24 saat, 36 saat veya yaklaşık bu kadar veya daha uzun bir süre önce uygulanabilir.

Bazı örneklerde, kortikosteroit hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasıyla aynı zamanda uygulanır. Bu örnekte, kortikosteroit hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronidazla birlikte veya ondan ayrı olarak uygulanabilir. Tipik olarak, kortikosteroit hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzimden ayrı olarak uygulanır. Başka örneklerde, kortikosteroit hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından 0.5 dakika, 1 dakika, 2 dakika, 3 dakika, 4 dakika, 5 dakika, 6 dakika, 7 dakika, 8 dakika, 9 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 20 dakika, 25 dakika, 30 dakika, 45 dakika, 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat, 5 saat, 6 saat, 7 saat, 8 saat, 9 saat, 10 saat, 11 saat, 12 saat, 18 saat, 24 saat, 36 saat veya yaklaşık bu kadar veya daha uzun süre sonra uygulanır.

Bir örnekte, kortikosteroit hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronidaz uygulamasından önce uygulanır. Örneğin kortikosteroit, örneğin deksametazon gibi bir glukokortikoit hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronidaz uygulamasından 1 saat önce uygulanır. Başka bir örnekte, kortikosteroit, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından 5 dakika önce uygulanır. Başka bir örnekte, kortikosteroit, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronidaz uygulamasından önce ve sonra uygulanır. Bu örnekte, kortikosteroit, örneğin deksametazon hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından bir ila beş dakika önce ve anti-hiyalüronan madde, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından sekiz saat sonra uygulanır. Başka bir örnekte, deksametazon gibi bir kortikosteroit hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından bir saat önce ve anti-hiyalüronan madde, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronan ayrıştırıcı enzim uygulamasından sekiz ila on iki saat sonra uygulanır.

Kortikosteroit dozunu uygulama zamanı hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin bir PEGillenmiş hiyalüronidaz uygulamasıyla ilişkili bir veya daha fazla yan etkiyi düzelttiği

sürece herhangi bir doz uygulama rejimi düşünülmektedir. Ayrıca, kortikosteroit dozu veya doz uygulama rejimi, bir kanserin veya katı tümörün tedavi edilmesi de dâhil olmak üzere, burada sunulan bileşimlerde ve kombinasyonlarda bulunan hiyalüronan ayrıştırıcı enzimin veya başka maddenin terapötik etkisine müdahale etmeyen veya bu etkiyi azaltmayan bir doz veya doz uygulama rejimidir.

Örneklerde açıklandığı ve gösterildiği gibi, bir glukokortikoit, örneğin deksametazon gibi bir kortikosteroidin uygulanması, özellikle hiyalüronan ayrıştırıcı enzim antikor uygulamasından 8-24 saat veya yaklaşık bu kadar süre önce uygulandığında, etkinliği bir hiyalüronan ayrıştırıcı enzim, örneğin PEGPH20 gibi bir hiyalüronidaz uygulamasıyla artan anti-CTLA4 ve anti-PD-L1 antikorları gibi kontrol noktası inhibitör terapisinin etkinliğini azaltmaz.

b. Kansere Karşı Maddeler ve Başka Tedaviler

Burada sunulan kombinasyon terapisi tek başına veya başka kansere karşı maddelerle kombinasyon halinde kullanılabilir. Kansere karşı madde(ler) veya tedavi(ler) ameliyat, radyasyon, ilaçlar, kemoterapötikler, polipeptitler, antikorlar, peptitler, küçük moleküller veya gen terapisi vektörleri, virüsler, DNA, aşılar, tümörle ilişkili antijenler, örneğin burada açıklanan (Bölüm G) veya bu alanda bilinen tümörle ilişkili antijenlerin herhangi birini veya daha fazlasını eksprese eden dendritik hücreler olabilir.

Buradaki kombinasyon terapisinin uygulanmasından sonra, onunla eş zamanlı olarak veya ondan önce uygulanabilen örnek kansere karşı maddeler arasında sınırlandırıcı olmamak koşuluyla Asivisinler; Avisinler; Aklarubisinler; Akodazoller; Akroninler; Adozelesinler; Aldeslökinler; Alemtuzumablar; Alitretinoinler (9-Cis-Retinoik Asitler); Allopurinoller; Altretaminler; Alvosidibler; Ambazonlar; Ambomisinler; Ametantronlar; Amifostinler; Aminoglutetimidler; Amsakrinler; Anastrozoller; Anaksironlar; Antitabinler; Antramisinler; Apazikonlar; Agrimesnalar; Arsenik Trioksitler; Asparaginazlar; Asperlinler; Antrimustinler; Azasitidinler; Azetepalar; Azotomisinler; Banoksantronlar; Batabulinler; Batimastatlar; BCG Canlı; Benaksibinler; Bendamustinler; Benzodepalar; Beksarotenler; Bevasizumab; Bikalutamidler; Bietaserpinler; Birikodarlar; Bisantrenler; Bisnafit Dimesilatlar; Bizelesinler; Bleomisinler; Bortezomibler; Brekinarlar; Bropiriminler; Budotitanlar; Busulfanlar; Kaktinomisinler; Kalusteronlar; Kanertinibler; Kapesitabinler; Karasemidler; Karbetimerler; Karboplatinler; Karbokonlar; Karmofurlar; Polifeprosanlarla birlikte Karmustinler; Karmustinler; Karubisinler; Karzelesinler;

Sedefingoller; Selekoksibler; Semadotinler; Klorambusiller; Sioteroneller; Siplatinler; Sirolemisinler; Sisplatinler; Kladribinler; Klanfenurlar; Klofarabinler; Krisnatoller; Siklofosfamidler; Sitarabin lipozomaller; Sitarabinler, Dakarbazinler; Daktinomisinler; Darbepoetin Alfalar; Daunorubisin lipozomaller; Daunorubisinler/Daunomisinler; Daunorubisinler; Desitabinler; Denilökin Diftitokslar; Deksniguldipineler; Deksonalar; Deksrazoksanlar; Dezaguaninler; Diazikonlar; Dibrospidyumlar; Dienogestler; Dinalinler; Disermolidler; Dosetakseller; Dofekidarlar; Doksifluridinler; Doksorubisin lipozomaller; Doksorubisin HCL; Doksorubisin HCL lipozom enjeksiyon; Doksorubisinler; Droloksifenler; Dromostanolon Propionatlar; Duazomisinler; Ekomustinler; Edatreksatlar; Edotekarinler; Eflornitinler; Elakridarlar; Elinafidler; Elliott's B Çözeltileri; Elsamitrusinler; Emitefurlar; Enloplatinler; Enpromatlar; Enzastaurinler; Epipropidinler; Epirubisinler; Epoetin alfalar; Eptaloprostlar; Erbulozoller; Ezorubisinler; Estramustinler; Etanidazoller; Etoglusidler; Etopozit fosfatlar; Etopozit VP-16'lar; Etopozitler; Etoprinler; Esemestanlar; Eksisulindler; Fadrozoller; Fazarabinler; Fenretinitler; Filgrastimler; Floksuridinler; Fludarabinler; Florourasiller; 5-florourasiller; Floksimesteronlar; Flurositabinler; Foskidonlar; Fostriesinler; Fostriesinler; Fotretaminler; Fulvestrantlar; Galarubisinler; Galositabinler; Gemsitabinler; Gemtuzumablar/Ozogamisinler; Gerokinoller; Gimatekanlar; Gimerasiller; Gloksazonlar; Glufosfamidler; Gozerelin asetatlar; Hidroksiüreler; İbritumomablar/Tiuksetanlar; İdarubisinler; İfosfamidler; İlmofozinler; İlomastatlar; İmatinib mesilatlar; İmeksonlar; İmprosulfanlar; İndisulamlar; İnprokonlar; İnterferon alfa-2a'lar; İnterferon alfa-2b'ler; İnterferon Alfalar; İnterferon Betalar; İnterferon Gamalar; İnterferonlar; İnterlökin-2'ler ve diğer İnterlökinler (rekombinant İnterlökinler dâhil); İntoplisinler; İobenguanlar [131-1]; İproplatinler; İrinotekanlar; İrsogladinler; İksabepilonlar; Ketotreksatlar; L-Alanozinler; Lanreotitler; Lapatinibler; Ledoksantronlar; Letrozoller; Lökovorinler; Löprolitler; Löprorelinler (Löprolitler); Levamizoller; Leksakalsitoller; Liarozoller; Lobaplatinler; Lometreksoller; Lomustinler/CCNU'ler; Lomustinler; Lonafarnibler; Lozoksantronlar; Lurtotekanlar; Mafosfamidler; Manosulfanlar; Marimastatlar; Mazoprokoller; Maytansinler; Mekloretaminler; Mekloretaminler/Azot hardallar; Megestrol asetatler; Megestroller; Melengestroller; Melfalanler; Menogariller; Mepitiostanlar; Merkaptopürinler; 6-Merkaptopürin; Mesnalar; Metesindler; Metotreksatlar; Metokssalenler; Metomidatlar; Metoprinler; Meturedepalar; Miboplatinler; Miproksifenler; Mizonidazoller; Mitindomidler; Mitokarsinler; Mitokrominler; Mitoflaksonlar; Mitogilinler;

Mitoguazonlar; Mitomalsinler; Mitomisin C'sler; Mitomisinler; Mitonafitler; Mitokidonlar; Mitosperler; Mitotanlar; Mitoksantronlar; Mitozolomidler; Mivobulinler; Mizoribinler; Mofarotenler; Mopidamoller; Mubritinibler; Mikofenolik Asitler; Nandrolon Fenpropionatlar; Nedaplatinler; Nelarabinler; Nemorubisinler; Nitrakrinler; Nokodazoller; Nofetumomablar; Nogalamisinler; Nolatreksedler; Nortopiksantronlar; Oktreotitler; Oprelvekinler; Ormaplatinler; Ortatakseller; Oterasiller; Oksaliplatinler; Oksisuranlar; Oksofenarsinler; Paklitakseller; Pamidronatlar; Patupilonlar; Pegademaslar; Pegaspargazlar; Pegfilgrastimler; Peldezinler; Peliomisinler; Pelitreksoller; Pemetreksedler; Pentamustinler; Pentostatinler; Peplomisinler; Perfosfamidler; Perifozinler; Pikoplatinler; Pinafitler; Pipobromanlar; Piposulfanlar; Pirfenidonlar; Piroksantronlar; Piksantronlar; Plevitreksedler; Plikamisinler; Plomestanlar; Plomestanlar; Porfimer sodyumlar; Porfimerler; Porfiromisinler; Prednimustinler; Prokarbazinler; Propamidinler; Prospidyumlar; Pumitepalar; Puromisinler; Pirazofurinler; Kinakrinler; Ranimustinler; Rasburikazlar; Riboprinler; Ritrosulfanlar; Rituksimablar; Rogletimidler; Rokinimeksler; Rufokromomisinler; Sabarubisinler; Safingoller; Sargramostimler; Satraplatinler; Sebriplatinler; Semustinler; Simtrazenler; Sizofiranlar; Sobuzoksanlar; Sorafenibler; Sparfozatlar; Sparfozik Asitler; Sparsomisinler; Spirogermanyumlar; Spiromustinler; Spiroplatinler; Spiroplatinler; Skalaminler; Streptonigrinler; Streptovarisinler; Streptozosinler; Sufosfamidler; Sulofenurlar; Sunitinib Malat; 6-tioguanin (6-TG); Tasedinalinler; Talklar; Talizomisinler; Talimustinler; Tamoksifenler; Tarikidarlar; Tauromustinler; Tekogalanlar; Tegafurlar; Teloksantronlar; Temoporfinler; Temozolomidler; Tenipozitler/VM-26'lar; Tenipozitler; Teroksironlar; Testolaktonlar; Tiamiprinler; Tioguaninler; Tiotepalar; Tiamiprinler; Tiazofurinler; Tilomizoller; Tiloronlar; Timkodarlar; Timonasikler; Tirapazaminler; Topiksantronlar; Topotekanlar; Toremifenler; Tositumomablar; Trabektedinler (Ekteinasidin 743); Trastuzumablar; Trestolonlar; Tretinoinler/ATRA; Trisiribinler; Trilostanlar; Trimetreksatlar; Triplatin Tetranitratlar; Triptorelinler; Trofosfamidler; Tubulozoller; Ubenimeksler; Urasil Hardallar; Uredepalar; Valrubisinler; Valspodarlar; Vapreotitler; Verteporfinler; Vinblastinler; Vinkristinler; Vindezinler; Vinepidinler; Vinfluninler; Vinformitler; Vinglisinatlar; Vinlösinoller; Vinlörozinler; Vinorelbinler; Vinrozidinler; Vintriptoller; Vinzolidinler; Vorozoller; Ksantomisin A'lar (Guamesiklinler); Zeniplatinler; Zilaskorblar [2-H]; Zinostatinler; Zoledronat; Zorubisinler; ve Zozukidarlar, örneğin: Aldeslökinler (örneğin PROLEUKIN®); Alemtuzumablar (örneğin CAMPATH®);

Alitretinoinler (örneğin PANRETIN®); Allopürinoller (örneğin ZYLOPRIM®); Altretaminler (örneğin HEXALEN®); Amifostinler (örneğin ETHYOL®); Anastrozoller (örneğin ARIMIDEX®); Arsenik Trioksitler (örneğin TRISENOX®); Asparaginazlar (örneğin ELSPAR®); BCG Canlı (örneğin TICE® BCG); Beksarotenler (örneğin TARGRETIN®); Bevasizumab (AVASTIN®); Bleomisinler (örneğin BLENOXANE®); Busulfan intravenöz (örneğin BUSULFEX®); ağızdan Busulfanlar (örneğin MYLERAN®); Kalusteronlar (örneğin METHOSARB®); Kapesitabinler (örneğin XELODA®); Karboplatinler (örneğin PARAPLATIN®); Karmustinler (örneğin BCNU®, BiCNU®); Polifeprosanlar içeren Karmustinler (örneğin GLIADEL® Wafer); Selekoksibler (örneğin CELEBREX®); Klorambusiller (örneğin LEUKERAN®); Sisplatinler (örneğin PLATINOL®); Kladribinler (örneğin LEUSTATIN®, 2-CdA®); Siklofosfamidler (örneğin CYTOXAN®, NEOSAR®); Sitarabinler (örneğin CYTOSAR-U®); Sitarabin lipozomaller (örneğin DepoCyt®); Dakarbazinler (örneğin DTIC-Dome): Daktinomisinler (örneğin COSMEGEN®); Darbepoetin Alfalar (örneğin ARANESP®); Daunorubisin lipozomaller (örneğin DAUNOXOME®); Daunorubisinler/Daunomisinler (örneğin CERUBIDINE®); Denilökin Diftitokslar (örneğin ONTAK®); Deksrazoksanlar (örneğin ZINECARD®); Dosetakseller (örneğin TAXOTERE®); Doksorubisinler (örneğin ADRIAMYCIN®, RUBEX®); Doksorubisin HCL enjeksiyonlar da dâhil olmak üzere Doksorubisin lipozomaller (örneğin DOXIL®); Dromostanolon propionatlar (örneğin DROMOSTANOLONE® ve MASTERONE® Enjeksiyon); Elliott's B Çözeltileri (örneğin Elliott's B Solution®); Epirubisinler (örneğin ELLENCE®); Epoetin alfalar (örneğin EPOGEN®); Estramustinler (örneğin EMCYT®); Etopozit fosfatlar (örneğin ETOPOPHOS®); Etopozit VP-16'lar (örneğin VEPESID®); Eksemestanlar (örneğin AROMASIN®); Filgrastimler (örneğin NEUPOGEN®); Floksudirinler (örneğin FUDR®); Fludarabinler (örneğin FLUDARA®); 5-FU'lar da dâhil olmak üzere Florourasiller (örneğin ADRUCIL®); Fulvestrantlar (örneğin FASLODEX®); Gemsitabinler (örneğin GEMZAR®); Gemtuzumablar/Ozogamisinler (örneğin MYLOTARG®); Gozerelin asetatlar (örneğin ZOLADEX®); Hidroksiüreler (örneğin HYDREA®); İbritumomablar/Tiuksetanlar (örneğin ZEVALIN®); İdarubisinler (örneğin IDAMYCIN®); İfosfamidler (örneğin IFEX®); İmatinib mesilatlar (örneğin GLEEVEC®); İnterferon alfa-2a'lar (örneğin ROFERON-A®); İnterferon alfa-2b'ler (örneğin INTRON A®); İrinotekanlar (örneğin CAMPTOSAR®); Letrozoller (örneğin FEMARA®); Lökovorinler (örneğin WELLCOVORIN®, LEUCOVORIN®);

Levamizoller (örneğin ERGAMISOL®); Lomustinler/CCNU'lar (örneğin CeeBU®); Mekloretaminler/Azot hardallar (örneğin MUSTARGEN®); Megestrol asetatlar (örneğin MEGACE®); Melfalanlar/L-PAM'lar (örneğin ALKERAN®); 6-merkaptopürinler (6-MP'ler; örneğin PURINETHOL®) de dâhil olmak üzere Merkaptopürin; Mesnalar (örneğin MESNEX®); Metotreksatlar; Metoksalenler (örneğin UVADEX®); Mitomisin C'ler (örneğin MUTAMYCIN®, MITOZYTREX®); Mitotanlar (örneğin LYSODREN®); Mitoksantronlar (örneğin NOVANTRONE®); Nandrolon Fenpropionatlar (örneğin DURABOLIN-50®); Nofetumomablar (örneğin VERLUMA®); Oprelvekinler (örneğin NEUMEGA®); Oksaliplatinler (örneğin ELOXATIN®); Paklitakseller (örneğin PAXENE®, TAXOL®); Pamidronatlar (örneğin AREDIA®); Pegademazlar (örneğin ADAGEN®); Pegaspargazlar (örneğin ONCASPAR®); Pegfilgrastimler (örneğin NEULASTA®); Pentostatinler (örneğin NIPENT®); Pipobromanlar (örneğin VERCYTE®); Plikamisin/Mitramisinler (örneğin MITHRACIN®); Porfimer sodyumlar (örneğin PHOTOFRIN®); Prokarbazinler (örneğin MATULANE®); Kinakrinler (örneğin ATABRINE®); Rasburikazlar (örneğin ELITEK®); Rituksimablar (örneğin RITUXAN®); Sargramostimler (örneğin PROKINE®); Streptozosinler (örneğin ZANOSAR®); Sunitinib Malatlar (örneğin SUTENT®); Talklar (örneğin SCLEROSOL®); Tamoksifenler (örneğin NOLVADEX®); Temozolomidler (örneğin TEMODAR®); Tenipozitler/VM-26'lar (örneğin VUMON®); Testolaktonlar (örneğin TESLAC®); 6-tioguanin (6-TG) de dâhil olmak üzere Tioguaninler; Tiotepalar (örneğin THIOPLEX®); Topotekanlar (örneğin HYCAMTIN®); Toremifenler (örneğin FARESTON®); Tositumomablar (örneğin BEXXAR®); Trastuzumablar (örneğin HERCEPTIN®); Tretinoinler/ATRA (örneğin VESANOID®); Urasil Hardallar; Valrubisinler (örneğin VALSTAR®); Vinblastinler (örneğin VELBAN®); Vinkristinler (örneğin ONCOVIN®); Vinorelbinler (örneğin NAVELBINE®); ve Zoledronatlar (örneğin ZOMETA®) yer alır.

H. Örnekler

Aşağıdaki örnekler sadece açıklama amacıyla dâhil edilmiş olup, buluşun çerçevesini sınırlandırmaları amaçlanmamaktadır.

Örnek 1

Hiyalüronan (HA) İçeriği Yüksek Sinjenik Tümör Fare Modellerinin Oluşturulması

A. Hiyalüronan (HA) İçeriği Yüksek Sinjenik Kolon Tümörü Fare Modellerinin Oluşturulması

1. Hiyalüronan (HA) İçeriği Yüksek CT26/HAS3 Hücre Hattının Oluşturulması

CT26 Balb/c fare kolon karsinomu hücreleri (ATCC, kat. no. CRL-2638) beşeri hiyalüronan sentaz 3'ü (HAS3) yapısal olarak eksprese etmek üzere oluşturuldu. pLV-EF1a-hHAS3-IRES-Hyg (DİZİ İD NO: 1) adı verilen bir lentivirus vektörü, HAS3 cDNA (DİZİ İD NO: 2), pLV-EF1a-MCS-IRES-Hyg (BioSettia, Inc.; DİZİ İD NO: 3) çoklu klonlama yeri içinde XbaI ve MluI kısıtlama yerleri arasına eklenerek oluşturuldu. CT26 hücreleri oluşan pLV-EF1a-hHAS3-IRES-Hyg vektörüyle (DİZİ İD NO: 1) enfekte edildi ve CT26/HAS3 hücreleri adı verilen sabit bir şekilde transdüksiyondan geçirilmiş hücreler higromisin işlemiyle seçildi. CT26/HAS3 hücreleri, 37°C ve %5 CO_2'de 2 mM L-glutamin ve %10 fetal büyükbaş hayvan serumuyla takviye edilmiş RPMI 1640 ortamında yapışık bir tek tabaka olarak doku kültüründe tutuldu.

2. Sinjenik CT26/HAS3 Tümör Modelinin Oluşturulması

Yukarıda kısım 1'de açıklandığı gibi CT26/HAS3 veya CT26 parental hücreleri, %80-90 konfluansta tripsinle toplandı, iki kez steril Hanks Dengeli Tuz Çözeltisiyle (HBSS) yıkandı ve HBSS'yle 4 x 10^6 hücre/mL konsantrasyonuna seyreltildi. Erkek Balb/c fareleri 4-6 haftalıkken Taconic Farms'tan elde edildi ve kafes başına 4 fare olarak barındırıldı. Tümör inokülasyonları için, farelere sağ tibial periosta bitişik olarak intramüsküler yolla 50 µL hücre süspansiyonu (toplam 2 x 10^5 hücre) enjekte edildi.

Tümör hacimleri VisualSonics Vevo 2100 ultrason (Toronto, Kanada) ve Vevo 2100 v1.5.0 görüntüleme yazılımı kullanılarak ultrasonla ölçüldü. Tümör hacimleri ölçülürken hayvanlara hafif izofluran anestezisi uygulandı. Tümör ölçümü için, ilgilenilen bölge ultrason jeliyle (Parker Laboratories, Fairfield, NJ) kaplandı ve RMV-716 (odak derinliği = 17.5 mm) tarama başlığı doğrudan ilgilenilen bölge üzerinde konumlandırıldı. 2D Kipindeyken tümörün yaklaşık merkezi bulundu ve sonra 3D kipi kullanılarak bir görüntü (~150-200 çerçeve) elde edildi. 150-200 çerçeveden yaklaşık 15-30 çerçeve analiz edildi ve bir tümör hacmi hesaplandı ve mm^3 olarak ifade edildi.

3. Tümör Dokusundaki HA Seviyelerinin Ölçümü

Tümör büyüme deneylerinin sonunda, tümörler kesilip çıkarıldı ve bölümler halinde ≤-60°C'de donduruldu. HA ölçümü için ekstraktları elde etmek için, tümör dokusu 24 saat

55°C'de bir tüp çalkalayıcıda bir mg doku için 40 µL miktarında, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$ ve 2 mM $CaCl_2$ içinde 1 mg/mL'de proteinaz K (Sigma, Kat. No. P4850) içeren bir çözelti kullanılarak sindirildi. Daha sonra proteinaz K 30 dakika 100°C'de ısıyla etkisizleştirildi, oluşan çözelti 4-10°C'de 20 dakika 10,000g'de santrifüjden geçirildi ve üst faz Hiyalüronan Duo Set ELISA (R&D Systems, Kat. No. DY3614) ile imalatçının talimatlarına göre HA ölçümü için kullanıldı. Standart eğri, 90 ng/mL'de başlayan altı toplam seyreltmenin üç katlı seyreltme serisi kullanılarak elde edildi ve bütün numuneler, oluşan konsantrasyonları 0.37-20 ng/mL aralığı içine düşecek şekilde seyreltildi. Bu prosedür kullanılarak, düşük Ha içerikli CT26 parental hücrelerinden üretilen tümörler 73 ± 8 ng HA/mg doku içeriyordu, yüksek HA içerikli CT26/HAS3 hücrelerinden üretilen tümörler ise 1087 ± 126 ng HA/mg doku içeriyordu.

B. Hiyalüronan (HA) İçeriği Yüksek Bir Sinjenik Pankreas Tümörü Fare Modelinin Oluşturulması

1. Hiyalüronan (HA) İçeriği Yüksek MH194/HAS3 Hücre Hattının Oluşturulması

MH194 fare pankreas karsinomu hücreleri (KrasLSL.G12D/+p53R172H/+PdxCretg/+ genetik olarak üretilmiş fare modelinden elde edildi), Örnek 1A'daki gibi yapısal olarak beşeri hiyalüronan sentaz 3 (HAS3) eksprese etmek üzere üretildi. MH194/HAS3 adı verilen sabit bir şekilde transdüksiyondan geçirilmiş hücreler, higromisin işlemiyle seçildi. MH194/HAS3 ve parental MH194 hücreleri 37°C'de ve %5 CO_2'de 2 mM L-glutamin ve %10 fetal büyükbaş hayvan serumuyla takviye edilmiş DMEM ortamında yapışık bir tek tabaka olarak doku kültüründe tutuldu.

2. Pankreas Yıldız Hücresi İzolasyonu ve Ölümsüzleştirilmesi

C57BL/6 farelerinden alınan pankreaslar tıraş bıçaklarıyla doğrandı ve Gey dengeli tuz çözeltisi (GBSS) içinde %005 kolajenaz P, %0.1 DNAse ve %0.02 Pronaz içeren sindirim tamponu (2 mL) içine konuldu. Her inkübasyondan sonra iyice karıştırılmak üzere, 37°C'de iki adet 15 dakikalık sindirim inkübasyonunun ardından, elde edilen hücre süspansiyonu 100 µm naylon elekten filtre edildi, GBSS içinde iki kez %0.3 büyükbaş hayvan serum albüminiyle (BSA) yıkandı ve 10 mL GBSS/BSA içinde yeniden süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonuna sekiz mL Histodenz (Sigma, Kat. No. D2158) ilave edildi ve kesintili bir yoğunluk gradyanı oluşturmak için bütün hacim 6 mL GBSS/BSA altında pipetlendi. Fren sıfıra ayarlanmak üzere 1,400 g'de 20 dakika santrifüjün ardından, istenen hücreler iki yoğunluk hacmi arasındaki ara yüzden toplandı

ve bir kez PBS ile ve bir kez 2 mM L-glutamin, %10 fetal büyükbaş hayvan serumu ve %1 amfoterisin-B ile takviye edilmiş DMEM ortamıyla (tam DMEM) yıkandı. Hücreler Lenti-SV40 (Capital Biosciences, Kat. No. CIP-0011) imalatçının protokolüylü kullanılarak ölümsüzleştirildi. PSC4 adı verilen oluşan hücre hattı, 37°C'de ve %5 CO_2'de tam DMAM içinde yapışık bir tek tabaka olarak doku kültüründe tutuldu.

3. Sinjenik MH194/HAS3 Tömör Modelinin Oluşturulması

Yukarıda kısım A'da açıklandığı gibi MH194/HAS3 hücreleri %80-90 konfluansta tripsinle toplandı, iki kez steril Hanks Dengeli Tuz Çözeltisiyle (HBSS) yıkandı ve HBSS'yle 4 x 10^6 hücre/mL konsantrasyonuna seyreltildi. Erkek C57BL/6 fareleri 4-6 haftalıkken Taconic Farms'tan elde edildi ve kafes başına 4 fare olarak barındırıldı. Tümör inokülasyonları için, farelere sağ tibial periosta bitişik olarak intramüsküler yolla 5 x 10^5 PSC4 (toplam 7 x 10^5 hücre) ile birlikte 2 x 10^5 MH194/HAS3 hücreleri veya parental MH194 hücreleri içeren 50 µL hücre süspansiyonu enjekte edildi.

Tümör hacimleri Örnek 1A2'deki gibi ultrasonla ölçüldü. 150-200 çerçeveden yaklaşık 15-30 çerçeve analiz edildi ve bir tümör hacmi hesaplandı ve mm^3 olarak ifade edildi. Örnek 1A3'te açıklanan HA ölçüm prosedürü kullanıldığında, parental MH194+PSC4 hücrelerinden üretilen tümörler 263 ± 16 ng HA/mg doku içeriyordu, MH194/HAS3+PSC4 hücrelerinden üretilen tümörler ise 1783 ± 99 ng HA/mg doku içeriyordu.

Örnek 2

HA İçeriği Yüksek Beşeri Ksenogreft Tümörü Fare Modelinin Oluşturulması

A. Hiyalüronan (HA) İçeriği Yüksek SKOV3/HAS2 Hücre Hattının Oluşturulması

SKOV3 beşeri yumurtalık kanseri hücreleri (ATCC, kat. no. HTB-77) beşeri hiyalüronan sentaz 2'yi (HAS2) yapısal olarak eksprese etmek için üretildi. HAS2 cDNA (DİZİ İD NO: 317), pLV-EF1a-hHAS2-IRES-Hyg vektörünü üretmek için lentivirüs vektörü pLV-EF1a-MCS-IRES-Hyg'in (BioSettia, Inc.; DİZİ İD NO: 3) çoklu klonlama yeri içinde XbaI ve MluI kısıtlama yerleri arasına eklendi. SKOV3 hücreleri oluşan vektörle enfekte edildi. Sabit bir şekilde transdüksiyondan geçirilmiş, SKOV3/HAS2 hücreleri adı verilen hücreler Higromisin işlemiyle seçildi. SKOV3/HAS2 hücreleri 37°C'de ve %5 CO_2'de 2 mM L-glutamin ve %10 fetal büyükbaş hayvan serumuyla takviye edilmiş McCoy 5A ortamı içinde bir yapışık tek tabaka olarak doku kültüründe tutuldu.

B. SKOV3/HAS2 Ksenogreft Tümörü Fare Modeli

Yukarıda kısım A'da açıklanan SKOV3/HAS2 hücreleri %80-90 konfluansta tripsinle toplandı, iki kez steril Hanks Dengeli Tuz Çözeltisiyle (HBSS) yıkandı ve HBSS'yle 100 x 10^6 hücre/ml konsantrasyonuna seyreltildi. Dişi çıplak fareler (nu/nu) 4-6 haftalıkken Taconic Farms'an alındı ve her kafese 4 hayvan yerleştirildi. Tümör inokülasyonları için farelere sağ tibial periosta bitişik olarak intramüsküler yolla 50 µL hücre süspansiyonu (toplam 5 x 10^6 hücre) enjekte edildi. Tümör hacimleri yukarıda Örnek 1B'de açıklandığı gibi ölçüldü.

Örnek 1A3'te açıklanan HA ölçüm prosedürü kullanılarak ölçüldüğünde, SKOV3/HAS2 hücrelerinde üretilen tümörler 2343 ± 199 ng HA/mg doku içeriyordu.

Örnek 3

Rekombinant Beşeri PH20'nin (rHuPH20) Üretilmesi ve Saflaştırılması

A. Bir Başlangıç Çözünür rHuPH20 Eksprese Eden Hücre Hattının Oluşturulması

Çin Hamsteri Yumurtalık (CHO) hücreleri HZ240 plazmitle (DİZİ İDNO: 4'te verilmektedir) transfekte edildi. Çözünür rHuPH20 ekspresyonu için HZ24 plazmit vektörü bir pCI vektör omurgası (Promega), beşeri PH20 hiyalüronidazın 1-482. amino asitlerini kodlayan DNA (DİZİ İD NO: 5), ECMV virüsünden (Clontech) bir iç ribozomal giriş yeri (IRES) ve fare dihidrofolat redüktaz (DHFR) geni içerir. pCI vektör omurgası ayrıca bir ampisilin direnç geni (AmpR), bir fl replikasyon orijini, bir Sitomegalovirüs dolaysız-erken hızlandırıcı/promotör bölgesi (CMV), bir kimerik intron ve bir SV40 geç poliadenilasyon sinyali (SV40) de içerir. Çözünür rHuPH20'yi kodlayan DNA, beşeri pH20'nin doğal 35 amino asitli sinyal dizisinin 1. amino asit pozisyonunda metionini kodlayan DNA'dan önce bir NheI yeri ve bir Kozak konsensus dizisi ve beşeri PH20 hiyalüronidazın (DİZİ İD NO: 6'da verilmektedir) 482. amino asit pozisyonuna karşılık gelen tirozini kodlayan DNA'nın ardından bir durdurma kodonu, ardından bir BamHI kısıtlama yeri içerir. Dolayısıyla pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24) oluşumu,iç ribozomal giriş yeriyle (IRES) ayrılan, beşeri pH20'nin 1-482. amino asitlerini (DİZİ İD NO: 7'de verilmektedir) ve fare dihidrofolat redüktazın 1-186. amino asitlerini (DİZİ İD NO: 8'de verilmektedir) kodlayan CMV promotörü tarafından sevkedilen tek bir mRNA türüyle sonuçlanır.

4 mM Glutamin ve 18 mL/L Pluronic 68/L (Gibco) ile takviye edilmiş, DHFR(-) hücreleri için GIBCO Modifiye CD-CHO ortamında üretilen transfekte olmamış HCO hücreleri, transfeksiyon için terkip içinde bir çalkalama şişesinde 0.5 x 10^6 hücre/mL seviyesinde tohumlandı. Hücreler nemli bir inkübatörde, 120 devir/dakikada çalkalanarak 37°C'de %5 CO_2'de üretildi. Katlanarak üreyen transfekte olmamış CHO hücreleri transfeksiyondan önce yaşayabilirlik açısından test edildi.

Transfekte olmamış CHO hücre kültürünün altı milyon yaşayabilir hücresi peletlendi ve 0.7 mL 2x transfeksiyon tamponu (2x HeBS: 40 mM HEPES, pH 7.0, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.4 mM Na_2HPO_4, 12 mM dekstroz) içinde 2 × 10^7 hücre yoğunluğuna yeniden süspansiyon haline getirildi. Yeniden süspansiyon haline getirilmiş hücrelerin her temsili miktarına, 0.09 mL (250 µg) doğrusal HZ24 plazmiti (gece boyunca ClaI (New England Biolabs) ile sindirilerek doğrusallaştırıldı) ilave edildi ve hücre/DNA çözeltileri oda sıcaklığında 0.4 cm gap BTX (Gentronics) elektroporasyon küvetleri içine aktarıldı. Hücrelerle hiç plazmit DNA'sı karıştırılmadan bir negatif kontrol elektroporasyonu uygulandı. Hücre/plazmit karışımları 330 V kapasitör boşaltımı ve 960 µF veya 350 V ve 950 µF ile elektroporasyona tabi tutuldu.

Hücreler elektroporasyondan sonra küvetlerden çıkarıldı ve 4 mM Glutamin ve 18 mL/L Pluronic F68/L (Gibco) ile takviye edilmiş, DHFR(-) hücreleri için 5 mL Modifiye CD-CHO ortamına aktarıldı ve nemli bir inkübatörde 2 gün 37°C'de ve %5CO_2'de seçim olmadan 6 kuyucuklu bir kültür plakasının bir kuyucuğunda üremeye bırakıldı.

Elektroporasyondan iki gün sonra, her kuyucuktan 0.5 mL doku kültürü ortamı çıkarıldı ve Örnek 4'te açıklanan mikrotürbidite tahlili kullanılarak hiyalüronidaz aktivitesinin varlığı açısından test edildi. En yüksek hiyalüronidaz aktivitesi seviyelerini eksprese eden hücreler doku kültürü kuyucuğundan alındı, sayıldı ve 1 mL için 1 × 10^4 ila 2 × 10^4 yaşayabilir hücreye seyreltildi. Beş adet, 96 kuyucuklu yuvarlak dipli doku kültürü plakasının her kuyucuğuna 0.1 mL'lik temsili miktarda hücre süspansiyonu aktarıldı. 4 mM GlutaMAX™-1 takviye (GIBCO™, Invitrogen Corporation) içeren ve hipoksantin ve timidin takviyeleri içermeyen, yüz mikrolitre CD-CHO ortamı (GIBCO) hücreleri içeren kuyucuklara ilave edildi (nihai hacim: 0.2 mL).

Metotreksat olmadan üretilen 5 plakadan on klon tanımlandı. Bu HZ24 klonlarının altısı kültürde büyütüldü ve tek hücre süspansiyonları olarak çalkalama şişelerine aktarıldı. 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 ve 4D10 klonları, hücrelerin, üst sol kuyucukta 5000 hücre ile

başlanarak, plakada aşağı doğru 1:2 ve yatay olarak 1:3 oranında seyreltildiği iki boyutlu bir sonsuz seyreltme stratejisi kullanılarak 96 kuyucuklu yuvarlak dipli doku kültürü plakalarına kaplandı. Seyreltilmiş klonlar, kuyucuk başına 500 adet transfekte olmamış DG44 CHO hücresi zemininde büyütülerek kültürde ilk günler için gerekli büyüme faktörleri elde edildi. Her alt klon için on plaka hazırlandı, 5 plaka 50 nM metotreksat içeriyordu ve 5 plaka metotreksat içermiyordu.

Klon 3D3 24 görsel alt klon üretti (13'ü metotreksat kullanılmayan işlemden ve 11'i 50 nM metotreksat işleminden). 24 alt klonun 8'inden üst fazlarda anlamlı hiyalüronidaz aktivitesi (>50 Birim/mL) ölçüldü ve bu 8 alt klon T-25 doku kültürü şişelerinde büyütüldü. Metotreksat işlemi protokolünden izole edilen klonlar 50 nM metotreksatın varlığında büyütüldü. Klon 3D35M çalkalama şişelerinde 500 nM metotreksat içinde daha da büyütüdü ve 1,000 Birim/mL'den fazla hiyalüronidaz aktivitesi üreten klonları oluşturdu (klon 3D35M; veya Gen1 3D35M). Daha sonra 3D35M hücrelerinin bir ana hücre bankası (MCB) hazırlandı.

B. Çözünür rHuPH20 Eksprese Eden İkinci Jenerasyon Hücre Hattının Oluşturulması

Yukarıda kısım A'da açıklanan Gen1 3D35M hücre hattı, jenerasyon 2 (Gen2) klonlarını üretmek için daha yüksek metotreksat seviyelerini adapte edildi. 3D35M hücreleri, var olan metotreksat içeren kültürlerden 4 mM GlutaMAX-1™ ve 1.0 µM metotreksat içeren CD CHO ortamına tohumlandı. Hücreler, büyütülerek ve 37°C, %7 CO_2 nemli inkübatörde 46 gün 9 kez geçirilerek daha yüksek bir metotreksat seviyesine adapte edildi. Büyütülmüş hücre popülasyonu, 2.0 µM metotreksat ihtiva eden ortamı içeren 96 kuyucuklu doku kültürü plakalarında sınırlandırıcı seyreltmeyle klonlandı. Yaklaşık 4 hafta sonra, klonlar saptandı ve klon 3E10B büyütme için seçildi. 3E10B hücreleri, 20 geçiş için 4 mM GlutaMAX-1™ ve 2.0 µM metotreksat içeren CD CHO ortamında büyütüldü. 3E10B hücre hattının bir ana hücre bankası (MCB) oluşturuldu ve donduruldu ve sonraki çalışmalar için kullanıldı.

Hücre hattının büyütülmesi, 3E10B hücreleri, 4 mM GlutaMAX-1™ ve 4.0 µM metotreksat içeren CD CHO ortamında kültürlenerek sürdürüldü. 12. geçişten sonra hücreler bir araştırma hücre bankası (RCB) olarak flakonlarda donduruldu. Bir RCB flakonu çözdürüldü ve 8.0 µM metotreksat içeren ortamda kültürlendi. 5 gün sonra, ortamdaki metotreksat konsantrasyonu 16.0 µM'ye çıkarıldı, 18 gün sonra 20.0 µM'ye

çıkarıldı. 20.0 µM metotreksat içeren ortamda 8. geçişten gelen hücreler, 4 mM GlutaMAX-1™ ve 20.0 µM metotreksat ihtiva eden CD CHO ortamı içeren 96 kuyucuklu doku kültürü plakalarında sınırlandırıcı seyreltmeyle klonlandı. Klonlar 5-6 hafta sonra saptandı ve klon 2B2, 20.0 µM metotreksat içeren ortamda büyütme için seçildi. 11. geçişten sonra, 2B2 hücreleri bir araştırma hücre bankası (RCB) olarak flakonlarda donduruldu.

Elde edilen 2B2 hücreleri, çözünür rekombinant beşeri PH20 (rHuPH20) eksprese eden dihidrofolat redüktaz eksikliği olan (dhfr-) DG44 CHO hücreleridir. Çözünür PH20, 2B2 hücrelerinde yaklaşık 206 kopya/kuyucuk kopya sayısında bulunur. SpeI-, XbaI- ve BamHI/HindIII ile sindirilmiş genomik 2B2 hücre DNA'sının rHuPH20'ye spesifik bir probun kullanıldığı Southern blot analizi, aşağıdaki kısıtlama sindirimi profilini ortaya koydu: SpeI ile sindirilmiş DNA'yla ~7.7 kb'lik bir ana hibridizasyon bantı ve dört tali hibridizasyon bantı (~13.9, ~6.6, ~5.7 ve ~4.6 kb); XbaI ile sindirilen DNA'yla ~5.0 kb'lik bir ana hibridizasyon bantı ve iki tali hibridizasyon bantı (~13.9 ve ~6.5 kb); ve BamHI/HindIII ile sindirilmiş 2B2 DNA kullanılarak ~1.4 kb'lik tek bir hibridizasyon bantı gözlemlendi. mRNA transkriptinin dizi analizi, elde edilen cDNA'nın (DİZİ İD NO: 9), beklenen sitozin (C) değil bir timidin (T) olduğu gözlemlenen 1131. pozisyondaki bir baz çifti farkı dışında referans diziye (DİZİ İD NO: 5) özdeş olduğunu gösterdi. Bu, amino asit dizisi üzerinde hiçbir etkisi olmayan sessiz bir mutasyondur.

C. 300 L Biyoreaktör Hücre Kültüründe Gen2 çözünür rHuPH20 üretimi

Bir flakon HZ24-2B2 hücresi (yukarıda kısım B'de açıklanmaktadır) çözdürüldü ve çalkalama şişelerinden 20 µM metotreksat ve GlutaMAX-1™ (Invitrogen) ile takviye edilmiş CD-CHO ortamında (Invitrogen, Carlsbad, CA) 36 L döner şişelere geçirilerek büyütüldü. Kısaca, bir hücre flakonu 37°C su banyosunda çözdürüldü, ortam ilave edildi ve hücreler santrifüjden geçirildi. Hücreler 125 mL'lik çalkalama şişesi içinde 20 mL taze ortamla yeniden süspansiyon haline getirildi ve 37°C, %7 CO_2 inkübatöre konuldu. Hacim 125 mL'lik çalkalama şişesinde 40 mL'ye yükseltildi. Hücre yoğunluğu 1.5 x 10^6 hücre/mL'yi aştığında, kültür 100 mL'lik kültür hacminde 125 mL'lik bir döner şişe içinde büyütüldü. Şişe 37°C, %7 CO_2'de inkübe edildi. Hücre yoğunluğu 1.5 x 10^6 hücre/mL'yi aştığında, kültür 200 mL kültür hacminde 250 mL'lik bir döner şişe içinde büyütüldü ve şişe 37°C, %7 CO_2'de inkübe edildi. Hücre yoğunluğu 1.5 x 10^6 hücre/mL'yi aştığında, kültür 800 mL kültür hacminde 1 L'lik bir döner şişe içinde büyütüldü ve 37°C, %7

CO_2'de inkübe edildi. Hücre yoğunluğu 1.5 x 10^6 hücre/mL'yi aştığında, kültür 5000 mL kültür hacminde 6 L'lik bir döner şişe içinde büyütüldü ve 37°C, %7 CO_2'de inkübe edildi. Hücre yoğunluğu 1.5 x 10^6 hücre/mL'yi aştığında, kültür 32 L kültür hacminde 36 L'lik bir döner şişe içinde büyütüldü ve 37°C, %7 CO_2'de inkübe edildi.

400 L'lik bir reaktör sterilize edildi ve 230 mL CD-CHO ortamı ilave edildi. Kullanımdan önce, reaktör kontaminasyon açısından kontrol edildi. 36 L'lik döner şişelerden 400 L'lik biyoreaktöre (Braun) yaklaşık olarak 30 L hücre, bir mL için 4.0 × 10^5 yaşayabilir hücre inokülasyon yoğunluğunda ve 260 L toplam hacimde aktarıldı. Parametreler şöyleydi: sıcaklık ayar noktası, 37°C; Pervane Hızı 40-55 devir/dakika; Kap Basıncı: 3 psi; Hava Serpintisi 0.5-1.5 L/Dakika; Hava Kaplama: 3 L/dakika. Hücre sayımı, pH doğrulama, ortam analizi, protein üretimi ve korunumu için reaktörden her gün numune alındı. Ayrıca çalışma sırasında, besinler ilave edildi. 120. saatte (5. gün), 10.4 L Besleme No. 1 Ortam (4× CD-CHO + 33 g/L glukoz + 160 mL/L GlutaMAX-1™ + 83 mL/L Yeastolate + 33 mg/L rHu insülin) ilave edildi. 168. saatte (7. gün), 10.8 L Besleme No. 2 (2× CD-CHO + 33 g/L glukoz + 80 mL/L GlutaMAX-1™ + 167 mL/L Yeastolate + 0.92 g/L sodyum bütirat) ilave edildi ve kültür sıcaklığı 36.5°C'ye düşürüldü. 216. saatte (9. gün) 10.8 L Besleme No. 3 (1× CD-CHO + 50 g/L glukoz + 50 mL/L GlutaMAX-1™ + 250 mL/L Yeastolate + 1.80 g/L sodyum bütirat) ilave edildi ve kültür sıcaklığı 36°C'ye düşürüldü. 264. saatte (11. gün), 10.8 L Besleme No. 4 (1× CD-CHO + 33 g/L glukoz + 33 mL/L GlutaMAX-1™ + 250 mL/L Yeastolate + 0.92 g/L sodyum bütirat) ilave edildi ve kültür sıcaklığı 35.5°C'ye düşürüldü. Besleme ortamı ilavesinin üretimin son safhalarında çözünür rHuPH20 üretimini dramatik bir şekilde arttırdığı gözlemlendi. Reaktör 14. veya 15. gün veya hücrelerin yaşayabilirliği %40'ın altına düştüğünde toplandı. İşlem, 12 milyon hücre/mL maksimum hücre yoğunluğuyla bir mL için 17,000 Birim nihai üretkenlikle sonuçlandı. Toplamada, mikoplazma, biyoyük, *in vitro* ve *in vivo* endotoksin ve virüs, Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) ve enzimatik aktivite için kültürden numune alındı.

Kültür bir peristaltik pompayla, her biri 4-8 µm olarak tasnif edilmiş bir diyatomlu toprak tabakası ve 1.4-1.1 µm olarak tasnif edilmiş bir diyatomlu toprak tabakası içeren, dört adet paralel Millistak filtrasyon sistemi modülü (Millipore), ardından bir selüloz membran, daha sonra 0.4-0.11 µm olarak tasnif edilmiş bir diyatomlu toprak tabakası ve <0.1 µm olarak tasnif edilmişbir diyatomlu toprak tabakası içeren ikinci bir tek Millistak filtrasyon sistemi (Millipore), ardından bir selüloz membran ve sonra 0.22 µm nihai filtreden 350 L

kapasiteye sahip steril bir tek kullanımlık esnek torbaya pompalandı. Toplanan hücre kültürü sıvısı 10 mM EDTA ve 10 mM Tris'le takviye edilerek pH 7.5'e getirildi. Kültür 30 kDa molekül ağırlığı kesme (MWCO) polieter sülfon (PES) filtreler (Sartorius) kullanılarak bir teğetsel akış filtrasyon (TFF) tertibatıyla 10× konsantre edildikten sonra, 10 mM Tris, 20 mM Na_2SO_4, pH 7.5 ile 10× tampon değişimiyle 0.22 µm nihai bir filtre vasıtasıyla 50 L steril depolama torbası içine pompalandı.

Konsantre, diafiltrasyondan geçirilmiş ürün virüs açısından etkisizleştirildi. Viral etkisizleştirmeden önce, bir %10 Triton X-100, %3 tri (n-bütil) fosfat (TNBP) çözeltisi hazırlandı. Konsantre, diafiltrasyondan geçirilmiş ürün, Q kolonunda saflaştırılmadan hemen önce 36 L cam reaksiyon kabında 1 saat %1 Triton X-100, %0.3 TNBP'ye maruz bırakıldı.

D. Gen2 çözünür rHuPH20'nin saflaştırılması

Bir Q Sepharose (Pharmacia) iyon değişimi kolonu (9 L reçine, H= 29 cm, D= 20 cm) hazırlandı. pH belirlemesi, iletkenlik ve endotoksin (LAL) tahlili için yıkama numuneleri alındı. Kolon, 5 kolon hacmi 10 mM Tris, 20 mM Na_2SO_4, pH 7.5 ile dengelendi. Viral etkisizleştirmenin ardından, konsantre, diafiltrasyondan geçirilmiş ürün (yukarıda kısım C'de açıklanmaktadır) 100 cm/saat akış hızında Q kolonuna yüklendi. Kolon, 5 kolon hacmi 10 mM Tris, 20 mM Na_2SO_4, pH 7.5 ve 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.0 ile yıkandı. Protein 10 mM HEPES, 400 mM NaCl, pH 7.0 ile 0.22 µm nihai filtre içinden steril torba içine elute edildi. Eluat numunesi biyoyük, protein konsantrasyonu ve hiyalüronidaz aktivitesi açısından test edildi. A_{280} absorbans değerleri değişimin başında ve sonunda alındı.

Daha sonra Fenil-Sepharose (Pharmacia) hidrofobik etkileşim kromatografisi yapıldı. Bir Fenil-Sepharose (PS) kolonu (19-21 L reçine, H=29 cm, D= 30 cm) hazırlandı. Yıkama toplandı ve pH, iletkenlik ve endotoksin (LAL tahlili) için numune alındı. Kolon, 5 kolon hacmi 5 mM potasyum fosfat, 0.5 M amonyum sülfat, 0.1 mM $CaCl_2$, pH 7.0 ile dengelendi. Q sepharose kolonundan protein eluatı 2 M amonyum sülfat, 1 M potasyum fosfat ve 1 M $CaCl_2$ stok çözeltileriyle takviye edilerek sırasıyla 5 mM, 0.5 M ve 0.1 mM konsantrasyonları elde edildi. Protein 100 cm/saat akış hızında PS kolonuna yüklendi ve kolon devridaimi toplandı. Kolon, 5 mM potasyum fosfat, 0.5 M amonyum sülfat ve 0.1 mM $CaCl_2$ pH 7.0'la 100 cm/saatte yıkandı ve yıkama toplanan devridaime ilave edildi. Kolon yıkamasıyla kombine edilen devridaim, 0.22 µm'lik bir nihai filtreden steril bir

torbaya geçirildi. Devridaimden biyoyük, protein konsantrasyonu ve enzim aktivitesi için numune alındı.

Bir aminofenil boronat kolonu (ProMedics) hazırlandı. Yıkama toplandı ve pH, iletkenlik ve endotoksin (LAL tahlili) için numune alındı. Kolon, 5 kolon hacmi 5 mM potasyum fosfat, 0.5 M amonyum sülfatla dengelendi. Saflaştırılmış proteini içeren PS devridaimi 100 cm/saat akış hızında aminofenil boronat kolonuna yüklendi. Kolon, 5 mM potasyum fosfat, 0.5 M amonyum sülfat, pH 7.0 ile yıkandı. Kolon 20 mM bisin, 0.5 M amonyum sülfat, pH 9.0 ile yıkandı. Kolon 20 mM bisin, 100 mM sodyum klorür, pH 9.0 ile yıkandı. Protein 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.9 ile elute edildi ve bir steril filtreden steril bir torbaya geçirildi. Elute edilmiş numune biyoyük, protein konsantrasyonu ve enzim aktivitesi açısından test edildi.

Hidroksiapatit (HAP) kolonu (Bio-Rad) hazırlandı. Yıkama toplandı ve pH, iletkenlik ve endotoksin (LAL tahlili) açısından test edildi. Kolon 5 mM potasyum fosfat, 100 mM NaCl, 0.1 mM $CaCl_2$, pH 7.0 ile dengelendi. Aminofenil boronatla saflaştırılmış protein 5 mM potasyum fosfat ve 0.1 mM $CaCl_2$ nihai konsantrasyonlarına kadar takviye edildi ve 100 cm/saat akış hızında HAP kolonuna yüklendi. Kolon 5 mM potasyum fosfat, pH 7, 100 mM NaCl, 0.1 mM $CaCl_2$'yle yıkandı. Kolon daha sonra 10 mM potasyum fosfat, pH 7, 100 mM NaCl, 0.1 mM $CaCl_2$ ile yıkandı. Protein 70 mM potasyum fosfat, pH 7.0 ile elute edildi ve 0.22 µm steril bir filtreden steril bir torbaya geçirildi. Elute edilmiş numune biyoyük, protein konsantrasyonu ve enzim aktivitesi açısından test edildi.

HAP ile saflaştırılmış protein daha sonra bir virüsten arındırma filtresinden geçirildi. Sterilize edilmiş Virosart® filtresi (Sartorius), ilk olarak 2 L 70 mM potasyum fosfat, pH 7.0 ile yıkanarak hazırlandı. Kullanımdan önce, filtreden geçirilmiş tampondan pH ve iletkenlik için numune alındı. HAP ile saflaştırılmış protein bir peristaltik pompayla 20 nM virüsten arındırma filtresinden pompalandı. 70 mM potasyum fosfat, pH 7.0 içinde filtreden geçirilmiş protein 0.22 µm'lik bir nihai filtreden steril bir torbaya geçirildi. Viral filtrasyondan geçirilmiş numune protein konsantrasyonu, enzim aktivitesi, oligosakarit, monosakari ve siyalik asit profili açısından test edildi. Numune işlemle ilişkili katışkılar açısından da test edildi.

Örnek 4

Çözünür rHuPH20'nin Hiyalüronidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Hücre kültürleri, plazma, saflaştırma fraksiyonları ve saflaştırılmış çözeltiler gibi nmunelerde çözünür rHuPH20'nin hiyalüronidaz aktivitesi, hiyalüronik asit serum albüminiyle bağlandığında çözünmez bir çökeltinin oluşumuna dayanan bir türbidimetrik tahlil veya plastik çok kuyucuklu mikrotitre plakalarına kovalent olarak bağlı olmayan biyotinlenmiş hiyalüronik asit (b-HA) substratının sindirimiyle enzimatik olarak aktif rHuPH20 veya PEGPH20 miktarını ölçen bir biyotinlenmiş-hiyalüronik asit substrat tahlili kullanılarak belirlendi.

A. Mikrotürbidite Tahlili

Çözünür rHuPH20'nin hiyalüronidaz aktivitesi, çözünür rHuPH20 belirlenmiş bir süre (10 dakika) sodyum hiyalüronatla (hiyalüronik asit) inkübe edildikten sonra sindirilmemiş sodyum hiyalüronat asitlenmiş serum albümini ilavesiyle çökeltilerek ölçülür. Elde edilen numunenin türbiditesi 30 dakikalık bir gelişim süresinden sonra 640 nm'de ölçülür. Sodyum hiyalüronat substrat üzerindeki enzim aktivitesinden kaynaklanan türbiditedeki azalma çözünür rHuPH20 hiyalüronidaz aktivitesinin bir ölçüsüdür. Usul, bir çözünür rHuPH20 tahlili çalışma referans standardının seyreltileriyle oluşturulan bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak uygulanır ve numune aktivitesi ölçümleri bu kalibrasyon eğrisine göre yapılır.

Numunenin seyreltileri Enzim Seyreltme Çözeltileri içinde hazırlandı. Enzim Seyreltme Çözeltisi 33.0 ± 0.05 mg hidrolize jelatin 25.0 mL 50 mM PIPES Reaksiyon tamponu (140 mM NaCl, 50 mM PIPES, pH 5.5) ve 25.0 mL enjeksiyon için steril su (SWFI) içinde eritilerek ve 0.2 mL %25 Buminat çözeltisi karışım içinde seyreltilerek ve 30 saniye vortekslenerek hazırlandı. Bu 2 saat içinde kullanım için yapıldı ve gerekli olana kadar buz üzerinde saklandı. Numuneler tahmini 1-2 U/mL'ye seyreltildi. Genel olarak, aşama başına maksimum seyreltme 1:100'ü aşmadı ve ilk seyreltme için başlangıç numune büyüklüğü 20 µL'nin altında değildi. Tahlili yapmak için gerekli olan minimum numune hacimleri şöyleydi: İşlem içi Numuneler, FPLC Fraksiyonları: 80 µL; Doku Kültürü Üst Fazları: 1 mL; Konsantre Malzeme: 80 µL; Saflaştırılmış veya Nihai Aşama Malzeme: 80 µL. Seyreltmeler Düşük Protein Bağlayıcı 96 kuyucuklu bir plakada üç kopya halinde yapıldı ve her seyreltmeden 30 µL Optilux siyah/saydam dipli plakalara (BD BioSiences) aktarıldı.

2.5 U/mL konsantrasyona sahip bilinen çözünür rHuPH20 seyreltileri Enzim Seyreltme Çözeltisi içinde hazırlanarak bir standart eğri oluşturuldu ve üç kopya halinde Optilux

plakasına ilave edildi. Seyreltiler 0 U/mL, 0.25 U/mL, 0.5 U/mL, 1.0 U/mL, 1.5 U/mL, 2.0 U/mL ve 2.5 U/mL'yi içeriyordu. 60 µL Enzim Seyreltme Çözeltisi içeren "boş tepkime maddesi" kuyucukları plakaya negatif bir kontrol olarak dâhil edildi. Daha sonra plaka kapatıldı ve 5 dakika 37°C'de bir ısı bloğu üzerinde ısıtıldı. Kapak çıkarıldı ve plaka 10 saniye çalkalandı. Çalkalandıktan sonra, plaka yeniden ısı bloğuna aktarıldı ve MULTIDROP 384 Liquid Handling Device, ılık 0.25 mg/mL sodyum hiyalüronat çözeltisiyle (100 mg sodyum hiyalüronat (LifeCore Biomedical) 20.0 mL SWFI içinde eritilerek hazırlandı. Bu, 2-4 saat veya tamamen eriyene kadar 2-8°C'de nazikçe döndürülerek ve/veya sallanarak karıştırıldı) hazırlandı. Reaksiyon plakası MULTIDROP 384'e aktarıldı ve reaksiyon, her kuyucuğa 30 µL sodyum hiyalüronat dağıtmak için başlatma tuşuna basılarak başlatıldı. Daha sonra plaka MULTIDROP 384'ten çıkarıldı ve plaka kapağı yerine yerleştirilmiş olarak bir ısı bloğuna aktarılmadan önce 10 saniye çalkalandı. Plaka 10 dakika 37°C'de inkübe edildi.

MULTIDROP 384, makineyi Serum Çalışma Çözeltisiyle hazırlayarak ve hacim ayarını 240 µL'ye (75 mL 500 mM Asetat Tampon Çözeltisi içinde 25 mL Serum Stok Çözeltisi [1 hacim At Serumu (Sigma) 9 hacim 500 mM Asetat Tampon Çözeltisiyle seyreltildi ve pH hidroklorik asitle 3.1'e ayarlandı]) değiştirerek reaksiyonu durdurmak üzere hazırlandı. Plaka ısı bloğundan çıkarıldı ve MULTIDROP 384'e yerleştirildi ve kuyucukları 240 µL serum Çalışma Çözeltisi dağıtıldı. Plaka çıkarıldı ve 10 saniye bir palak okuyucusu üzerinde çalkalandı. 15 dakika daha sonra, numunelerin türbiditesi 640 nm'de ölçüldü ve her numunenin hiyalüronidaz aktivitesi (U/mL olarak) standart eğriye uydurularak belirlendi.

Spesifik aktivite (Birim/mg), hiyalüronidaz aktivitesi (U/mL) protein konsantrasyonuna (mg/mL) bölünerek hesaplandı.

B. Biyotinlenmiş Hiyalüronan Tahlili

Biyotinlenmiş-hiyalüronik asit tahlili, plastik çok kuyucuklu mikrotitre plakalarına kovalent olarak bağlı olmayan büyük molekül ağırlıklı bir (~1.2 megadalton) biyotinlenmiş hiyalüronik asit (b-HA) substratının sindirimiyle biyolojik numunelerdeki enzimatik olarak aktif rHuPH20 veya PEGPH20 miktarını ölçer. Standartlardaki ve numunelerdeki rHuPH20 veya PEGPH20 37°C'de b-HA ile kaplı bir plakada inkübe olmaya bırakılır. Bir dizi yıkamanın ardından, kalan yarılmamış/bağlı b-HA Streptavidin Yaban Turpu Peroksidaz konjugatıyla (SA-HRP) işlemden geçirilir. Hareketsizleştirilmiş SA-HRP ve kromojenik substrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) arasındaki reaksiyon, mavi renkli bir çözelti üretir. Reaksiyon asitle durdurulduktan sonra, çözünür sarı reaksiyon ürününün oluşumu, bir mikrotitre plakası spektrofotometresi kullanılarak 450 nm'de absorbans okunarak belirlenir. Biyotinlenmiş hiyalüronik asit (b-HA) substrat üzerindeki enzim aktivitesinden kaynaklanan 450 nm'deki absorbans azalması, çözünür rHuPH20 hiyalüronidaz aktivitesinin bir ölçüsüdür. Usul, bir çözünür rHuPH20 veya PEGPH20 referans standardının seyreltileriyle oluşturulan bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak uygulanır ve numune aktivitesi ölçümleri bu kalibrasyon eğrisine göre yapılır.

Numune ve kalibratör seyreltileri Tahlil Seyrelticisi içinde hazırlandı. Tahlil Seyrelticisi haacim/hacim olarak %1 havuzlanmış plazma (uygun türden) HEPES, pH 7.4 içinde %0.1 (ağırlık/hacim) BSA'ya ilave edilerek hazırlandı. Bu günlük olarak hazırlandı ve 2-8°C'de saklandı. Tür tipinin yanı sıra beklenen hiyalüronidaz seviyesine bağlı olarak, en az bir numune seyreltisinin kalibrasyon eğrisi aralığı içine girmesini sağlamak için tek veya çoklu seyreltiler hazırlandı. Test numunesi seyreltisinin/seyreltilerinin seçimine kılavuzluk etmek için, hiyalüronidaz aktivite seviyelerini hesaplamak üzere uygulanan hiyalüronidaz dozu, uygulama yolu, türün yaklaşık plazma hacmi ve zaman noktası hakkındaki bilgiler kullanıldı. Her numune seyreltisi kısa darbeli vortekslemeyle hazırlandığı haliyle karıştırıldı ve seyreltiler arasında pipet uçları değiştirildi. Genel olarak, seyreltmeler bir ilk 50 veya 100 kat seyreltmeyle başlatıldı, ardından ek seri seyreltmeler yapıldı. rHuPH20 veya PEGPH20'nin (uygulanan tedaviye bağlı olarak) yedi noktalı bir kalibrasyon eğrisi, rHuPH20 için 0.04 ila 3.0 U/mL ve PEGPH20 için 0.037 ila 27 U/mL konsantrasyonu aralığında hazırlandı. Her test numunesi seyreltisinden yüz mikrolitre (100 µL) ve kalibrasyon eğrisi noktası, önceden 0.1 mg/mL'de kuyucuk başına 100 µL b-HA ile kaplanmış ve PBS içinde 250 µL %1.0 (ağırlık/hacim) büyükbaş hayvan serum albüminiyle bloke edilmiş 96 kuyucuklu bir mikrotitre plakasının (Immulon 4HBX,

Thermo) üçlü kuyucuklarına uygulandı. Plaka(lar) bir yapışkan plaka contasıyla kapatıldı ve yaklaşık 90 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon döneminin sonunda, yapışkan conta plakadan çıkarıldı, numuneler aspire edildi ve plaka bir otomatik plaka yıkayıcı (BioTek ELx405 Select CW, Program '4HBX1') kullanılarak beş (5) kez kuyucuk başına 300 µL Yıkama Tamponuyla (10 mM fosfat tampon, 2.7 mM potasyum klorür, 137 mM sodyum klorür, pH 7.4, %0.05 (hacim/hacim) Tween 20, PBST) yıkandı. Kuyucuk başına yüz mikrolitre Streptavidin-HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi [20 mM Tris-HCl, 137 mM sodyum klorür, %0.025 (hacim/hacim) Tween 20, %0.1 (ağırlık/hacim) büyükbaş hayvan serum albümini içinde Streptavidin-HRP konjugatı (1:5,000 hacim/hacim) ilave edildi. Plaka kapatıldı ve çalkalanmadan ve ışıktan korunarak yaklaşık 60 dakika çevre sıcaklığında inkübe olmaya bırakıldı. İnkübasyon döneminin sonunda, yapışkan conta plakadan çıkarıldı, numuneler aspire edildi ve plaka yukarıda açıklandığı gibi beş (5) kez kuyucuk başına 300 µL Yıkama Tamponuyla yıkandı. Her kuyucuğa TMB çözeltisi (çevre sıcaklığında) ilave edildi ve yaklaşık beş (5) dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe olmaya bırakıldı. Daha sonra kuyucuk başına 100 µL TMB Durdurma Çözeltisi (KPL, Katalog No. 50-85-06) ilave edildi. 450 nm'de her kuyucuğun absorbansı bir mikrotitre plakası spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Kalibrasyon Eğrisinin her plakadaki yanıtı 4 parametrelik bir lojistik eğri uyumu kullanılarak modellendi. Her bilinmeyenin hiyalüronidaz aktivitesi, kalibrasyon eğrisinden interpolasyonla hesaplandı, numune seyreltme faktörüne göre düzeltildi ve U/mL cinsinden bildirildi.

Örnek 5

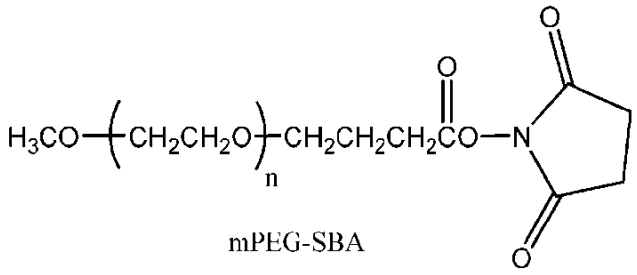
rHuPH20'nin PEGilasyonu

rHuPH20, enzimin metoksi poli(etilen glikol) bütanoik asidin doğrusal N-hidroksisüksinimidil esteriyle (mPEG-SBA-30K) reaksiyonuyla PEGillendi (PEGPH20).

A. mPEG-SBA-30K'nin rHuPH20'ye Konjugasyonu

Örnek 3'te açıklandığı gibi oluşturulan rHuPH20 (büyüklüğü yaklaşık 60 kDa), yaklaşık molekül ağırlığı 30 kDa olan, metoksi poli(etilen glikol) bütanoik asidin (mPEG-SBA-30K) bir doğrusal N-hidroksisüksinimidil esterine konjuge edildi. mPEG-SBA yapısı aşağıda şema 2'de gösterilmektedir:

Şema 2



mPEG-SBA

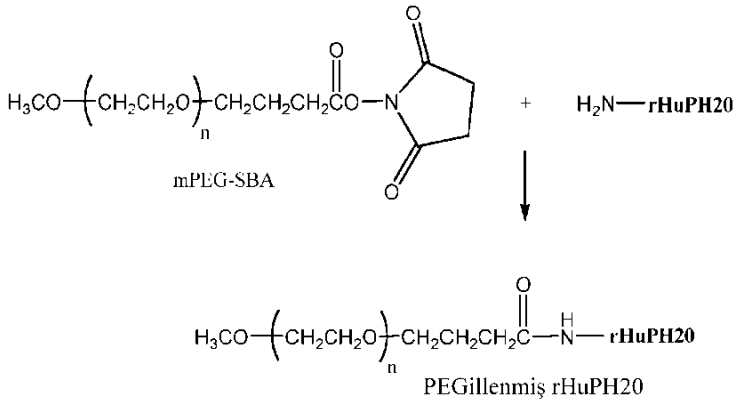
rHuPH20'yi PEGillemek için kullanılan mPEG-SBA-30K'yi hazırlamak için kullanılan usuller örneğin U.S. 5,672,662'de açıklanmaktadır. Kısaca, mPEG-SBA-30K aşağıdaki prosedüre göre hazırlanır:

Dioksan içinde eritilmiş bir etilmalonat (2 eşdeğer) çözeltisi, bir azot atmosferi altında sodyum hidrür (2 eşdeğer) ve toluene damla damla ilave edilir. mPEG metan sülfonat (1 eşdeğer, MW 30 kDa, Shearwater) toluen içinde eritilir ve yukarıdaki karışıma ilave edilir. Elde edilen karışım yaklaşık 18 saat geri akıtılır. Reaksiyon karışımı orijinal hacminin yarısına konsantre edilir, %10 sulu NaCl çözeltisiyle ekstrakte edilir, %1 sulu hidroklorik asitle ekstrakte edilir ve sulu ekstraktlar birleştirilir. Toplanan sulu tabakalar diklorometanla ekstrakte edilir (3x) ve organik tabaka magnezyum sülfatla kurutulur, filtre edilir ve kuruyana kadar buharlaştırılır. Elde edilen tortu sodyum klorür içeren 1 N sodyum hidroksit içinde eritilir ve karışım 1 saat karıştırılır. Karışımın pH'si 6 N hidroklorik asit ilavesiyle yaklaşık 3'e ayarlanır. Karışım diklorometanla ekstrakte edilir (2x).

Organik tabaka magnezyum sülfat üzerinde kurutulur, filtre edilir, konsantre edilir ve soğuk dietil eter içine dökülür. Çökelti filtrasyonla toplanır ve vakum altında kurutulur. Elde edilen bileşik dioksan içinde eritilir ve 8 saat geri akıtıldıktan sonra kuruyana kadar konsantre edilir. Elde edilen tortu su içinde eritilir ve diklorometanla ekstrakte edilir (2x) magnezyum sülfat üzerinde kurutulur ve çözelti döner buharlaştırmayla konsantre edildikten sonra soğuk dietil eter içine dökülür. Çökelti filtrasyonla toplanır ve vakum altında kurutulur. Elde edilen bileşik (1 eşdeğer) diklorometan içinde eritilir ve N-hidroksisüksinimid (2.1 eşdeğer) ilave edilir. Çözelti 0°C'ye soğutulur ve diklorometan içindeki bir disikloheksilkarbodiimid (2.1 eşdeğer) çözeltisi damla damla ilave edilir. Çözelti yaklaşık 18 saat oda sıcaklığında karıştırılır. Reaksiyon karışımı filtreden geçirilir, konsantre edilir ve dietil eter içinde çökeltilir. Çökelti filtrasyonla toplanır ve vakum altında kurutularak mPEG-SBA-30K elde edilir.

PEGillenmiş rHuPH20'yi hazırlamak için, mPEG-SBA-30K kovalent konjugasyonla rHuPH20'nin amino grubuna/gruplarına bağlanarak Şema 3'te gösterildiği gibi rHuPH20 ve mPEG arasında stabil amid bağları temin edildi.

Şema 3:



Konjugasyon için, mPEG-SBA-30K toz formunda rHuPH20'ye ilave edildi (130 mM NaCl /10 mM HEPES; pH 7 içinde 10 mg/mL konsantrasyonunda). PEG:rHuPH20 oranı 10:1'di (molar oran). PEG tampon içinde eritildikten sonra, çözelti steril filtrasyona tabi tutuldu (Corning 50 mL Tüp üst filtre, polistiren, selüloz asetat 0.22 μm membran). Konjugasyon 4°C'de soğuk bir odada karıştırılarak gece boyunca uygulandı.

Konjugasyonun ardından çözelti, bir 100,000 MWCO TFF membran kullanılarak konsantre edildi ve tampon pH 6.8'de 130 mM NaCl/10 mM HEPES'le değiştirildi. Yukarıda Örnek 4'te açıklandığı gibi, enzim aktivitesi için test edilen elde edilen malzeme pH 6.8'de 130 mM NaCl/10 mM HEPES kullanılarak seyreltilmek suretiyle 100,000 U/mL (yaklaşık 2.5 mg peptit/mL'ye karşılık gelir) nihai enzim aktivitesi elde edildi. Bu PEGillenmiş rHuPH20 malzemesi, 1 mL'lik hacimler halinde, bromobütil contalı 13 mm Tip-1 cam flakon içine doldurulduktan ve dondurulmuş halde saklandı (gece boyunca -20°C dondurucuda dondurulduktan sonra daha uzun depolama için -80°C dondurucuya konuldu).

B. PEGillenmiş rHuPH20'nin Analizi

PEGillenmiş rHuPH20 malzemes jel elektroforezle tahlil edildi. Yukarıda kısım A'daki gibi hazırlanan PEGillenmiş rHuPH20'nin üç partisi, farklı mesafeler giden, reaksiyona girmemiş PEG ve birçok mPEG-rHuPH20 konjugatı türünü temsil eden, birden fazla bantın özdeş bir örüntüsünü ortaya koydu. Bir molekül ağırlığı markörünün göçüyle karşılaştırma temelinde, türü temsil eden bantlar yaklaşık 90 kDa ila 300 kDa

aralığındaydı, üç koyu bant 240 kDa markörün üzerine göç etti. Bu veriler mPEG-SBA-30K'nin kovalent konjugasyonuyla oluşturulan PEGillenmiş rHuPH20'nin, muhtemelen mono-, di- ve tri-PEGillenmiş protein de dâhil olmak üzere PEGillenmiş rHuPH20 türlerinin heterojen bir karışımını içerdiğini gösteriyordu. 60 kDa'da görünür bir bantın olmaması, bütün proteinin PEG'le reaksiyona girdiğini ve karışımda hiçbir saptanabilir doğal rHuPH20'nin olmadığını göstermektedir.

Örnek 6

Anti-CTLA4 antikoru ve Hiyalüronidazın HA içeriği yüksek Sinjenik CT26 Tümörü Fare Modelindeki etkisi

HA içeriği yüksek CT26 sinjenik tümörleri olan fareler, Örnek 1A2'de açıklandığı gibi oluşturuldu ve tek başına veya anti-CTLA4'le kombinasyon halinde Örnek 5'te açıklanan PEGPH20'yle veya uygun kontrollerle aşağıdaki gibi tedavi edildi:

A. PEGPH20 ve Anti-CTLA4'ün Birlikte Uygulanması

Ortalama tümör hacmi 185± 24 mm^3 olmak üzere, yüksek HA içerikli CT26 sinjenik tümörleri içeren fareler, her grubun ortalama tümör hacminin esas itibarıyla aynı olacağı şekilde, her biri 7 fare içeren tedavi gruplarına randomize edildi. Tedaviler aşağıda Tablo 11'de gösterildiği gibi, 1, 4, 8 ve 11. günlerde haftada iki kez uygulandı. Örnek 5'te açıklandığı gibi PEGPH20 veya Aktif Farmasötik Bileşen (API) tamponu (10 mM histidin, 130 mM NaCl, pH 6.5) intravenöz (IV) yolla uygulandı ve anti-CTLA4 (BioXCell Inc, Kat. No. BE0164), fare IgG2b (BioXCell Inc, Kat. No. BE0086) izotip kontrolü veya salin intraperitonal (IP) yolla uygulandı (hepsi belirtilen doz seviyelerinde). Tümör hacimleri 0, 3, 7, 10 ve 14. günlerde ölçüldü. Tümör hacimleri 2000 MM^3'e ulaştığında, hayvanlar karbondioksit doz aşımıyla öldürüldü.

Tablo 11. PEGPH20 ve anti-CTLA4 Tedavi Koşulları					
Grup	**n**	**Tedavi 1**	**PEGPH20 dozu (mg/kg)**	**Tedavi 2**	**IG dozu (mg/kg)**
1	7	API tampon	0	Salin	0
2	7	API tampon	0	Fare IgG2b	4
3	7	PEGPH20	1, 0.0375*	Salin	0
4	7	API tampon	0	anti-CTLA4	2
5	7	API tampon	0	anti-CTLA4	4
6	7	API tampon	0	anti-CTLA4	8
7	7	PEGPH20	1, 0.0375*	anti-CTLA4	4
* PEGPH20 dozu 1. gün 1 m/kg ve 4, 8 ve 11. gün 0.0375 mg/kg'ydi					

Sonuçlar Tablo 12'de sunulmaktadır. Tümör büyümesi inhibisyonu (TGI) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: 1-(tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$)/(tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$) x %100. Sonuçlar sadece salin (1. Grup) veya kontrol antikoru (2. Grup) uygulanan kontrol hayvanlarında tümörlerin çalışma boyunca ilerleyici bir büyüme gösterdiğini ortaya koymaktadır. Tek başına PEGPH20 uygulanan hayvanlarda (3. Grup) tümörler, çalışma tamamlandığında tedavi edilmemiş tümörlerin büyüklüğünün yaklaşık yarısına düştü. Test edilen dozların hepsinde anti-CTLA4'le tedavi edilen hayvanlarda da (4-6. Grup) tümörler küçüldü ve PEGPH20 tedavisiyle olandan biraz daha büyük ölçüde azaldı. 2 mg/kg (4. Grup) ve 4 mg/kg (5. Grup) anti-CTLA4 uygulaması, tümör büyümesinde benzer bir azalmayla sonuçlandı, 8 mg/kg anti-CTLA4 uygulanan grupta (6. Grup) tümör hacminde daha büyük bir azalma gözlemlendi. Tek başına maddelerin biriyle tedavi edilen hayvanlarla kıyaslandığında, PEGPH20 ve 4 mg/kg anti-CTLA4'ün birlikte uygulanması tümör hacminde daha fazla bir azalmayla sonuçlandı. Bu azalma, uygulamadan sonraki daha önceki zamanlarda herhangi bir başka tedavi grubu için gözlemlenen azalmadan fazlaydı, ama 14. gün itibarıyla, tümör hacmi artmaya başladığı için, tümör büyüklüğü maksimum anti-CTLA4 dozu (8 mg/kg) uygulanan hayvanlarda (6. Grup) gözlemlenenle esas itibarıyla aynıydı.

Tablo 12. Sonuçlar							
		Tümör Hacmi (mm^3), Ortalama ± SFM					TGI
Grup	Tedavi	0. Gün	3. Gün	7. Gün	10. Gün	14. Gün	
1	salin kontrol	186 ± 11	385 ± 17	630 ± 41	1030 ± 87	2243 ± 203	-
2	4 mg/kg IgG2b	187 ± 9	336 ± 14	612 ± 43	866 ± 94	1773 ± 231	-
3	PEGPH20	186 ± 10	231 ± 26	453 ± 45	743 ± 84	1427 ± 199	%40
4	2 mg/kg α-CTLA4	186 ± 10	364 ± 15	576 ± 44	607 ± 35	1114 ± 103	%55
5	4 mg/kg α-CTLA4	186 ± 9	367 ± 31	527 ± 37	540 ± 83	1157 ± 223	%53
6	8 mg/kg α-CTLA4	185 ± 9	338 ± 22	530 ± 53	466 ± 57	952 ± 129	%63
7	PEGPH20 + 4 mg/kg α-CTLA4	185 ± 9	216 ± 27	352 ± 39	412 ± 55	982 ± 206	%61

B. Birlikte Uygulamanın Önceden PEGPH20 Uygulamasıyla Karşılaştırılması

PEGPH20'nin anti-CTLA4'le birlikte uygulanmasıyla karşılaştırmalı olarak anti-CTLA4 tedavisinden önce ön PEGPH20 uygulamasının etkilerini değerlendirmek için, ortalama tümör hacmi 215 ± 32 mm^3 olan, CT26HAS3 tümörleri içeren fareler tedavi gruplarına randomize edildi. Her grubun ortama tümör hacminin esas itibarıyla aynı olacağı şekilde her grup 9 fare içeriyordu. Her grup için uygulanan tedaviler aşağıda Tablo 13'te verilmektedir. Bütün tedavi grupları için, PEGPH20 veya API tampon 1, 4, 8 ve 11. günlerde haftada iki kez intravenöz (IV) yolla uygulandı. Farelere ayrıca salin, fare IgG2b izotip kontrolü veya anti CTLA4 Tablo 13'te gösterilen doz seviyelerinde intraperitonal (IP) olarak uygulandı. 4. ve 5. Gruplardaki farelere anti-CTLA4 antikoru PEGPH20 tedavisiyle aynı gün birlikte uygulandı. 6. Gruptaki farelere belirtildiği gibi anti-CTLA4

tedavisinden önceki gün (0, 3, 7 ve 10. günler) PEGPH20 önceden uygulandı ve anti-CTLA4 24 saat sonra (1, 4, 8 ve 11. günler) uygulandı.

Tümör hacimleri 0, 3, 7, 10 ve 14. günler ölçüldü. Tümör hacimleri 2000 mm^3'e ulaştığında, hayvanlar karbondioksit doz aşımıyla öldürüldü.

Tablo 13. PEGPH20 ve anti-CTLA4 Tedavi Koşulları

Grup	n	Tedavi 1	PEGPH20 (mg/kg)	Tedavi 2	IG (mg/kg)
1	9	API tampon	0	Salin	0
2	9	API tampon	0	Fare IgG2b	4
3	9	PEGPH20	0.0375	Salin	0
4	9	API tampon	0	anti-CTLA4	4
5	9	PEGPH20	0.0375	anti-CTLA4	4
6	9	PEGPH20*	0.0375*	anti-CTLA4	4
* 6. grup için PEGPH20 dozu anti-CTLA4 dozundan 24 saat önce uygulandı					

Sonuçlar Tablo 14'te sunulmaktadır. Tümör büyümesi inhibisyonu (TGI) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: 1-(tümör hacmi, test ürünü$_{(son\ gün)}$-tümör hacmi, test ürünü$_{(başlangıç\ ölçümü)}$)/(tümör hacmi, taşıyıcı$_{(son\ gün)}$-tümör hacmi, taşıyıcı$_{(başlangıç\ ölçümü)}$) x %100. Önceki çalışmadaki sonuçlara benzer bir şekilde, tek başına salin (1. Grup) veya kontrol antikoru (2. Grup) uygulanan kontrol hayvanlarındaki tümörler çalışma boyunca ilerleyici büyüme gösterdi. Tek başına PEGPH20 uygulanan hayvanlardaki (3. Grup) tümörler çalışma tamamlandığında tedavi edilmemiş tümörlerin büyüklüğünün yaklaşık yarısına düştü (taşıyıcıya göre $p < 0.05$). Sadece anti-CTLA4 uygulanan hayvanlardaki (4. Grup) ortalama tümör büyüklüğü de kontrol hayvanlarına kıyasla azaldı (taşıyıcıya göre $p < 0.05$). PEGPH20 ve anti-CTLA4 alan hayvanlarda (5. ve 6. Grup) ortalama tümör büyüklüğü, tek tek tedavilerle karşılaştırıldığında hacim olarak daha da azaldı. Tümör hacmindeki en büyük azalma, PEGPH20 ve anti-CTLA4 alan, PEGPH20'nin anti-CTLA4 uygulamasından 24 saat önce uygulandığı hayvanlarda (6. Grup) gözlemlendi (tek başına anti-CTLA4'e göre $p=0.0152$). Bu çalışmanın sonuçları, hem PEGPH20 hem anti-CTLA4 uygulandığında tümör büyümesinde daha büyük bir azalma olduğunu göstermektedir, bu azalma PEGPH20 anti-CTLA4 uygulamasından önce uygulandığında artmaktadır.

Tablo 14. Sonuçlar							
Grup	Tedavi	Tümör hacmi (mm^3), Ortalama ± SEM					TGI
		0. Gün	3. Gün	7. Gün	10. Gün	14. Gün	
1	salin kontrol	218 ± 12	381 ± 20	672 ± 54	1004 ± 95	1938 ± 154	-
2	IgG2b kontrol	216 ± 12	377 ± 13	670 ± 42	1072 ± 72	2210 ± 203	-
3	PEGPH20	215 ± 12	253 ± 15	429 ± 44	658 ± 81	1196 ± 183	%43
4	4 mg/kg α-CTLA4	215 ± 11	367 ± 22	545 ± 36	574 ± 64	904 ± 117	%60
5	PEGPH20 + 4 mg/kg α-CTLA4	213 ± 10	258 ± 9	423 ± 23	479 ± 29	784 ± 56	%67
6	PEGPH20* + 4 mg/kg α-CTLA4	214 ± 11	242 ± 10	351 ± 24	378 ± 49	573 ± 77	%79
* 6. grup için PEGPH20 dozu anti-CTLA4 dozundan 24 saat önce uygulandı							

C. PEGPH20'den Önce, Sonra ve Onunla Birlikte Uygulanan Anti-CTLA4'ün Doza Bağımlı Etkisi

PEGPH20'nin anti-CTLA4'ten önce, sonra veya onunla birlikte uygulanmasının etkisini değerlendirmek için, ortalama tümör hacmi 201 ± 27 mm^3 olan, CT26/HAS3 tümörleri içeren fareler, her grubun ortalama tümör hacminin esas itibarıyla aynı olacağı şekilde, her biri 9 fare içeren tedavi gruplarına randomize edildi. Dozaj rejimi Tabl 15'te verilmektedir. 9. Grup dışında bütün tedavi gruplarında, PEGPH20 veya API tampon kontrolü 1, 4, 8 ve 11. günler haftada iki kez intravenöz (IV) yolla uygulandı. 4, 5 ve 7. Gruplara ayrıca 1, 4, 8 ve 11. günlerde anti-CTLA4 uygulandı, 5. ve 7. Gruplara 0.0375 mg PEGPH20 ve 1 mg/kg anti-CTLA4 (5. Grup) veya 4 mg/kg anti-CTLA4'le (7. Grup) birlikte uygulandı. 6. ve 8. Gruplardaki farelere anti-CTLA4 tedavisinden önceki gün (0, 3, 7 ve 10. günler) önceden PEGPH20 uygulandı ve 24 saat sonra (1, 4, 8 ve 11. günler) sırasıyla 1 mg/kg veya 4

mg/kg anti-CTLA4 uygulandı. 9. Grupta PEGPH20 bir son uygulama olarak verildi, burada farelere 0, 3, 7 ve 10. günlerde anti-CTLA4 uygulandı ve 24 saat sonra 1, 4, 8 ve 11. günler PEGPH20 uygulandı.

PEGPH20 veya API tampon intravenöz (IV) yolla uygulandı ve anti-CTLA4, fare IgG2b izotip kontrolü veya salin intraperitonal (IP) yolla uygulandı (hepsi belirtilen doz seviyelerinde). Tümör hacimleri 0, 3, 7, 10 ve 14. günler ölçüldü.

Tablo 15. PEGPH20 ve anti-CTLA4 Tedavi Koşulları

Grup	**n**	**Tedavi**	**PEGPH20 dozu (mg/kg)**	**Tedavi 2**	**IG dozu (mg/kg)**
1	9	API tampon	0	Salin	0
2	9	API tampon	0	Fare IgG2b	4
3	9	PEGPH20	0.0375	Salin	0
4	9	API tampon	0	anti-CTLA4	1
Grup	**n**	**Tedavi**	**PEGPH20 dozu (mg/kg)**	**Tedavi 2**	**IG dozu (mg/kg)**
5	9	API tampon	0	anti-CTLA4	4
6	9	PEGPH20*	0.0375*	anti-CTLA4	1
7	9	PEGPH20	0.0375	anti-CTLA4	4
8	9	PEGPH20*	0.0375*	anti-CTLA4	4
9	9	PEGPH20**	0.0375**	anti-CTLA4	4
* PEGPH20 dozu anti-CTLA4 dozundan 24 saat önce uygulandı.					
** PEGPH20 dozu anti-CTLA4 dozundan 24 saat sonra uygulandı.					

Sonuçlar Tablo 16'da sunulmaktadır. Tümör büyümesi inhibisyonu (TGI) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: 1-(tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$)/(tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$) x %100. Daha önce açıklanan deneylerin sonuçlarına benzer bir şekilde, tek başına salin (1. Grup) veya kontrol antikoru (2. Grup) uygulanan kontrol hayvanlarındaki tümörler çalışma boyunca ilerleyici büyüme gösterdi. Tek başına PEGPH20 uygulanan hayvanlarda (3. Grup) kontrol hayvanlarıyla karşılaştırıldığında nihai %41 tümör büyümesi inhibisyonu (TGI)

gözlemlendi. 1 mg/kg (4. Grup) veya 4 mg/kg (5. Grup) dozunda tek başına anti-CTLA4 uygulanması sırasıyla %49 TGI ve %57 TGI ile sonuçlandı.

PEGPH20 ile 1 mg/kg ve 4 mg/kg anti-CTLA4'ün birlikte uygulanması sırasıyla %57 ve %65 TGI verdi. Yukarıda açıklanan sonuçlarla uyumlu olarak, PEGPH20'nin birlikte uygulanması maddelerin birinin uygulanmasıyla karşılaştırıldığında TGI'yi arttırdı. Bu sonuçlar, PEGPH20'nin önceden uygulanmasının gözlemlenen TGI'yi daha da arttırdığını, PEGPH20'nin anti-CTLA4'le tedaviden sonra uygulanmasının TGI'yi daha fazla arttırmadığını göstermektedir. Örneğin PEGPH20'nin 4 mg/kg anti-CTLA4 uygulamasından önce uygulanması, maddeler birlikte uygulandığında %65 olan TGI'nin PEGPH20'nin antikor uygulamasından 24 saat önce uygulandığı durumda %79'a çıkmasıyla sonuçlandı (tek başına anti-CTLA4'le karşılaştırıldığında $p = 0.0011$). PEGPH20 1 mg/kg anti-CTLA4 tedavisinden 24 saat önce uygulandığında daha az bir etki gözlemlendi (tek başına anti-CTLA4'e göre $p = 0.0641$). PEGPH20 4 mg/kg anti-CTLA4'ten sonra uygulandığında, PEGPH20'nin hiçbir yararı yoktu (tek başına anti-CTLA4 antikoruna göre $p = 0.35$). Sonuçlar PEGPH20'nin anti-CTLA4 antikoru uygulamasından önce uygulandığı bir dozaj rejiminin TGI'de önemli bir artışla sonuçlandığını göstermektedir.

Tablo 16. Sonuçlar							
Grup	**Tedavi**	**Tümör hacmi (mm^3), Ortalama ± SEM**					
		0. Gün	**3. Gün**	**7. Gün**	**10. Gün**	**14. Gün**	**TGI**
1	salin kontrol	202 ± 10	339 ± 14	589 ± 40	1005 ± 99	1960 ± 212	-
2	IgG2b kontrol	202 ± 10	331 ± 6	556 ± 39	998 ± 78	2117 ± 114	-
3	PEGPH20	201 ± 10	243 ± 15	387 ± 36	648 ± 73	1245 ± 167	%41
4	1 mg/kg α-CTLA4	201 ± 9	335 ± 17	479 ± 41	679 ± 98	1090 ± 178	%49
5	4 mg/kg α-CTLA4	201 ± 9	328 ± 10	448 ± 22	559 ± 45	965 ± 126	%57
6	PEGPH20* + 1 mg/kg α-CTLA4	201 ± 9	249 ± 11	351 ± 13	531 ± 46	929 ± 103	%59
7	PEGPH20 + 4 mg/kg α-CTLA4	202 ± 9	249 ± 17	353 ± 12	492 ± 24	822 ± 62	%65
8	PEGPH20* + 4 mg/kg α-CTLA4	202 ± 9	245 ± 17	292 ± 14	377 ± 34	579 ± 56	%79
9	PEGPH20** + 4 mg/kg α-CTLA4	201 ± 10	265 ± 9	375 ± 25	538 ± 50	990 ± 101	%55
* PEGPH20 dozu anti-CTLA4 dozundan 24 saat önce uygulandı.							
** PEGPH20 dozu anti-CTLA4 dozundan 24 saat sonra uygulandı.							

D. Önceden Uygulanan PEGPH20'nin Doza Bağımlı Etkisi

PEGPH20'nin öncden uygulanmasının etkilerinin doza bağımılı olup olmadığını değerlendirmek için, ortalama tümör hacmi 211 ± 33 mm^3 olmak üzere CT26/HAS3 tümörleri olan fareler tedavi gruplarına randomize edildi. Her grubun ortalama tümör

hacmi esas itibarıyla aynı olacak şekilde her tedavi grubu 10 fare içeriyordu. Tedavi edilen gruplar için dozaj rejimi Tablo 17'de verilmektedir. Bütün tedavi gruplarına, 0 (API tampon kontrolü) veya 0.0375 mg/kg veya 1 mg/kg PEGPH20 1, 4, 8 ve 11. günler haftada iki kez intravenöz (IV) yolla uygulandı. 4. Gruba ayrıca 1, 4, 8 ve 11. günler 4 mg/kg anti-CTLA4 uygulandı. 5 ve 6. gruplarda, farelere Tablo 17'de belirtildiği gibi, 0, 3, 7 ve 10. günlerde sırasıyla 1 mg/kg veya 0.0375 mg/kg dozunda önceden PEGPH20 uygulandı ve 24 saat sonra 1, 4, 8 ve 11. günler anti-CTLA4 uygulandı. Anti-CTLA4 veya salin tedavileri intraperitonal (IP) yolla uygulandı. Tümör hacimleri 0, 3, 7, 10 ve 14. günler ölçüldü.

Tablo 17. PEGPH20 ve anti-CTLA4 Tedavi Koşulları

Grup	n	Tedavi 1	PEGPH20 dozu (mg/kg)	Tedavi 2	IG dozu (mg/kg)
1	10	API tampon	0	Salin	0
2	10	PEGPH20	0.0375	Salin	0
3	10	PEGPH20	1	Salin	0
4	10	API tampon	0	anti-CTLA4	4
5	10	PEGPH20*	1*	anti-CTLA4	4
6	10	PEGPH20*	0.0375*	anti-CTLA4	4
* 5. ve 6. gruplarda PEGPH20 dozu anti-CTLA4 dozundan 24 saat önce uygulandı.					

Sonuçlar Tablo 18'de sunulmaktadır. Tümör büyümesi inhibisyonu (TGI) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: 1-(tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$)/(tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$) x %100. Yukarıda açıklanan sonuçlara benzer bir şekilde, tek başına salin (1. Grup) uygulanan kontrol hayvanlarındaki tümörler çalışma boyunca ilerleyici büyüme gösterdi. 0.0375 mg/kg (2. Grup) veya 1 mg/kg (3. Grup) tek başına PEGPH20 uygulanan hayvanlarda kontrol hayvanlarıyla karşılaştırıldığında ortalama tümör hacimleri biraz azaldı. Bu deneyde gözlemlenen PEGPH20 etkinliğindeki azalma bu deneylerde kullanılan hayanlarda daha az tümöral HA bulunmasına bağlı olabilir. Tek başına anti-CTLA4 (4 mg/kg) uygulaması (4. Grup) taşıyıcı kontrolle karşılaştırıldığında tümör hacminde %50'den biraz daha fazla bir azalmayla sonuçlandı. 0.0375 veya 1 mg/kg dozunda PEGPH20 önceden uygulanmak üzere kombinasyon halinde anti-CTLA4 alan hayvanlarda, PEGPH20'nin farklı dozları

arasında az fark olmak üzere, sadece anti-CTLA4'le tedavi edilen hayvanlara kıyasla daha da azalmış bir tümör hacmi gözlemlendi.

Tablo 18. Sonuçlar

Grup	Tedavi	Tümör hacmi (mm^3), Ortalama ± SEM					TGI
		0. Gün	3. Gün	7. Gün	10. Gün	14. Gün	
1	salin kontrol	212 ± 12	359 ± 18	610 ± 26	946 ± 76	1908 ± 196	-
2	37.5 µg/kg PEGPH20	211 ± 11	262 ± 10	527 ± 19	904 ± 48	1820 ± 106	%5
3	1 mg/kg PEGPH20	212 ± 11	238 ± 10	497 ± 27	878 ± 74	1735 ± 137	%10
4	4 mg/kg α-CTLA4	212 ± 11	358 ± 17	509 ± 35	594 ± 66	972 ± 117	%55
5	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg α-CTLA4	210 ± 10	230 ± 20	315 ± 21	518 ± 43	816 ± 87	%64
6	37.5 µg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg α-CTLA4	211 ± 10	258 ± 13	326 ± 23	460 ± 41	758 ± 82	%68

Örnek 7

Anti-PD-L1 antikorunun ve önceden uygulanan Hiyalüronidazın HA içeriği yüksek Sinjenik MH194+PSC4 Tümörü Fare Modelindeki Etkisi

Örnek 1'de açıklandığı gibi hazırlanan, ortalama tümör hacmi 168± 24 mm^3olmak üzere HA içeriği yüksek MP194+PSC4 sinjenik tümörleri olan fareler, her grup için ortalama tümör hacmi esas itibarıyla aynı olacak şekilde, her biri 8 fare içeren tedavi gruplarına randomize edildi. Örnek 5'te açıklandığı gibi PEGPH20 veya Aktif Farmasötik Bileşen (API) tamponu (10 mM histidin, 130 mM NaCl, pH 6.5) 0, 3, 7, 10, 14 ve 17. günler intravenöz (IV) yolla uygulandı ve anti-PD-Ll (BioXCell Inc, klon 10F.9G2, Kat. No. BE0101) veya sıçan IgG2b (BioXCell Inc, Kat. No. BE0090) izotip kontrolü 1, 4, 8, 11, 15

ve 18. günler intraperitonal (IP) yolla uygulandı (hepsi Tablo 19'da gösterilen doz seviyelerinde). Tümör hacimleri 0, 3, 7, 10, 14, 17 ve 21. günler ölçüldü.

Tablo 19. PEGPH20 ve anti-PD-L1 Tedavi Koşulları

Grup	n	Tedavi 1	PEGPH20 dozu (mg/kg)	Tedavi 2	IG dozu (mg/kg)
1	8	API tampon	0*	Sıçan IgG2b	4
2	8	PEGPH20	1*	Sıçan IgG2b	4
3	8	API tampon	0*	anti-PD-L1	1
4	8	PEGPH20	1*	anti-PD-L1	1
5	8	API tampon	0*	anti-PD-L1	2
6	8	PEGPH20	1*	anti-PD-L1	2
7	8	API tampon	0*	anti-PD-L1	4
8	8	PEGPH20	1*	anti-PD-L1	4

* PEGPH20 veya API tampon anti-PD-L1 dozundan 24 saat önce uygulandı.

Sonuçlar Tablo 20'de sunulmaktadır. Tümör büyümesi inhibisyonu (TGI) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: 1-(tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$)/(tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$) x %100. Sonuçlar, tek başına API tampon ve izotip kontrolü uygulanan kontrol hayvanlarında (1. Grup) yüksek HA içerikli MH194-PSC4 tümörlerinde, çalışma boyunca ilerleyici büyüme olduğunu göstermektedir. Tek başına PEGPH20 uygulanan hayvanlarda (2. Grup) tümörlerin büyümesi anlamlı bir şekilde (1. Gruba göre $p = 0.004$) azalarak çalışma tamamlandığında taşıyıcı/izotip ile tedavi edilen tümörlerin büyüklüğünün yaklaşık 2/3'üne geldi. Test edilen dozların hepsinde anti-PD-L1'le tedavi edilen hayvanlarda (3, 5 ve 7. Gruplar) tümörlerin büyümesi anlamlı bir şekilde azaldı (1, 2 ve 4 mg/kg dozunda anti-PD-L1 için sırasıyla ($p = 0.0015$, 0.0008 ve <0.0001). 1 mg/kg dozunda PEGPH20'nin 2 mg/kg anti-PD-L1'den 24 saat önce uygulanması (6. Grup), tek başına 2 mg/kg anti-PD-L1'le ($p = 0.005$) veya tek başına 1 mg/kg PEGPH20'yle ($p = 0.007$) karşılaştırıldığında tümör hacminde anlamlı olarak daha yüksek bir azalmayla sonuçlandı. Sonuçlar, PEGPH20 ve anti-PD-L1'le kombinasyon tedavisinin tümör büyümesini tek tek PEGPH20 veya anti-PD-L1'den daha iyi azalttığını göstermektedir.

Tablo 20. Sonuçlar					
Grup	**Tedavi**	**Tümör Hacmi (mm^3), Ortalama ± SEM**			
		0. Gün	**3. Gün**	**7. Gün**	**10. gün**
1	API tampon* + 4 mg/kg sıçan IgG2b	172 ± 8	277 ± 17	469 ± 22	581 ± 38
2	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg sıçan IgG2b	171 ± 8	254 ± 14	318 ± 29	479 ± 42
3	API tampon* + 1 mg/kg α-PD-L1	170 ±9	315 ± 17	506 ± 33	587 ± 32
4	1 mg/kg PEGPH20* +1 mg/kg α-PD-L1	164± 6	223 ± 13	300 ± 31	452 ± 46
5	API tampon* + 2 mg/kg α-PD-L1	171 ± 8	294 ± 16	427 ± 44	553 ± 47
6	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-L1	164 ± 10	237 ± 7	270 ± 26	372 ± 23
7	API tampon* + 4 mg/kg α-PD-L1	169 ± 12	294 ± 19	321 ± 23	309 ± 32
8	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg α-PD-L1	162 ± 9	249 ± 12	247 ± 22	303 ± 28

Grup	Tedavi	Tümör Hacmi (mm^3), Ort. ± SEM			TGI
		14. Gün	17. Gün	21. Gün	
1	API tampon* + 4 mg/kg sıçan IgG2b	852 ± 70	1182 ± 86	2145 ± 140	-
2	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg sıçan IgG2b	647 ± 64	937 ± 86	1468 ± 112	%34
3	API tampon* + 1 mg/kg α-PD-L1	739 ± 56	1016 ± 100	1626 ± 109	%26
4	1 mg/kg PEGPH20* +1 mg/kg α-PD-L1	578 ± 65	774 ± 101	1300 ± 211	%43
5	API tampon* + 2 mg/kg α-PD-L1	613 ± 72	909 ± 136	1761 ± 226	%19
6	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-L1	398 ± 46	578 ± 72	1029 ± 139	%57
7	API tampon* + 4 mg/kg α-PD-L1	332 ± 60	384 ± 78	667 ± 158	%75
8	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg α-PD-L1	343 ± 40	421 ± 65	664 ± 88	%75
*API tampon veya PEGPH20, anti-PD-L1 veya izotip kontrolü dozundan 24 saat önce uygulandı.					

Örnek 8

Anti-PD-L1 antikorunun ve Önceden uygulanan Hiyalüronidazın Düşük Dozunun HA içeriği yüksek Sinjenik MH194+PSC4 Tümörü Fare Modelindeki Etkisi

Ortalama tümör hacmi 131 ± 20 mm^3olmak üzere, Örnek 1'de açıklandığı gibi oluşturulan HA içeriği yüksek MH194+PSC4 sinjenik tümörleri olan fareler, her grubun ortalama tümör hacminin esas itibarıyla aynı olacağı şekilde her biri 8 fare içeren tedavi gruplarına randomize edildi. Örnek 5'te açıklandığı gibi PEGPH20 veya Aktif Farmasötik Bileşen (API) tamponu (10 mM histidin, 130 mM NaCl, pH 6.5) 0, 3, 6, 8, 12, 15 ve 19. günler intravenöz (IV) yolla uygulandı ve anti-PD-L1 (BioXCell Inc, klon 10F.9G2, Kat. No.

BE0101) veya sıçan IgG2b (BioXCell Inc, Kat. No. BE0090) izotip kontrolü 1, 4, 7, 9, 13, 16 ve 20. günlerde intraperitonal (IP) yolla uygulandı (hepsi Tablo 21'de gösterilen doz seviyelerinde). Tümör hacimleri 0, 2, 6, 9, 13, 16 ve 20. günler ölçüldü.

Tablo 21. PEGPH20 ve anti-PD-L1 Tedavi Koşulları

Grup	n	Tedavi 1	PEGPH20 dozu (mg/kg)	Tedavi 2	IG dozu (mg/kg)
1	8	API tampon	0*	Sıçan IgG2b	2
2	8	API tampon	0*	anti-PD-L1	2
3	8	PEGPH20	1*	Sıçan IgG2b	2
4	8	PEGPH20	1*	anti-PD-L1	2
5	8	PEGPH20	0.0375*	Sıçan IgG2b	2
6	8	PEGPH20	0.0375*	anti-PD-L1	2

* PEGPH20 veya API tampon IgG2b veya anti-PD-L1 dozundan 24 saat önce uygulandı.

37.5 µg/kg PEGPH20'nin bir beşeri eşdeğer dozu olup, burada beşeri doz 3 µg/kg'dir. Sonuçlar Tablo 22'de sunulmaktadır. Tümör büyümesi inhibisyonu (TGI) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: 1-(tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$)/(tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$) x %100. Sonuçlar, tek başına API tampon ve izotip kontrolü uygulanan kontrol hayvanlarında (1. Grup) yüksek HA içerikli MH194+PSC4 tümörlerinin, çalışma boyunca ilerleyici büyüme gösterdiğini ortaya koydu. Tek başına anti-PD-L1 uygulanan hayvanlarda (2. Grup) tümörlerin büyümesi anlamlı bir şekilde azalarak (1. Gruba göre $p = 0.049$) çalışma tamamlandığında taşıyıcı/izotiple tedavi edilen tümörlerin büyüklüğünün yaklaşık 2/3'üne geldi. 37.5 µg/kg PEGPH20'nin 2 mg/kg anti-PD-L1'den 24 saat önce uygulanması (6. Grup), tek başına 2 mg/kg anti-PD-L1 ($p < 0.0001$) veya tek başına 37.5 µg/kg PEGPH20 ($p < 0.0001$) ile karşılaştırıldığında tümör hacminde anlamlı bir şekilde daha yüksek bir azalmayla sonuçlandı ve ayrıca 2 mg/kg anti-PD-L1'den 24 saat önce 1 mg/kg PEGPH20'yle (4. Grup) karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde artmış bir tümör büyümesi inhibisyonuyla sonuçlandı ($p < 0.0001$).

Sonuçlar, 37.5 µg/kg PEGPH20 ve anti-PD-L1 kombinasyon tedavisinin, tümör büyümesini 1 mg/kg PEGPH20 ve anti-PD-L1 kombinasyonundan daha iyi azalttığını

göstermektedir. Bu dozaj insanlarda kullanılan dozajlara karşılık gelen kemirgen dozajıdır. Dolayısıyla, hiyalüronan ayrıştırıcı enzim dozajı titre edilebilir veya seçilebilir.

Tablo 22. Sonuçlar

Grup	Tedavi	Tümör Hacmi (mm^3), Ortalama ± SEM			
		0. Gün	2. Gün	6. Gün	9. gün
1	API tampon* + 2 mg/kg sıçan IgG2b	129 ± 8	272 ± 13	399 ± 20	523 ± 35
2	API tampon* + 2 mg/kg α-PD-L1	134 ± 8	240 ± 27	323 ± 33	317 ± 50
3	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg sıçan IgG2b	130 ± 8	262 ± 30	330 ± 30	428 ± 47
4	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-L1	131 ± 8	178 ± 10	208 ± 21	252 ± 54
5	37.5 µg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg sıçan IgG2b	129 ± 5	192 ± 15	331 ± 40	441 ± 42
6	37.5 µg/kg PEGPH20* +2 mg/kg α-PD-L1	134 ± 7	233 ± 24	225 ± 35	146 ± 28

Grup	Tedavi	Tümör Hacmi (mm^3), Ort. ± SEM			TGI
		13. Gün	16. Gün	20. Gün	
1	API tampon* + 2 mg/kg sıçan IgG2b	777 ± 75	1064 ± 113	1362 ± 135	-
2	API tampon* + 2 mg/kg α-PD-L1	606 ± 90	834 ± 154	982 ± 217	%31
3	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg sıçan IgG2b	717 ± 83	943 ± 128	1420 ± 227	-%5
4	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-L1	388 ± 77	582 ± 91	701 ± 167	%54
5	37.5 µg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg sıçan IgG2b	715 ± 64	1013 ± 54	1493 ± 91	-%11
6	37.5 µg/kg PEGPH20* +2 mg/kg α-PD-L1	146 ± 38	259 ± 59	270 ± 76	%89
*API tampon veya PEGPH20, anti-PD-L1 veya izotip kontrolü dozundan 24 saat önce uygulandı.					

Örnek 9

Anti-PD-1 antikorunun ve Önceden Uygulanan Hiyalüronidazın HA içeriği yüksek Sinjenik MH194+PSC4 Tümörü Fare Modelindeki Etkisi

HA içeriği yüksek MH194-PSC4 sinjenik tümörleri olan fareler Örnek 1'de açıklandığı gibi üretildi ve tek başına ve anti-PD-1'le kombinasyon halinde Örnek 5'te açıklanan PEGPH20'yle veya uygun kontrollerle aşağıdaki gibi tedavi edildi:

A. PEGPH20 Ön Uygulaması ve Yüksek anti-PD-1 Dozu

Ortalama tümör hacmi 128 ± 24 mm^3 olmak üzere, yüksek HA içerikli MH194+PSC4 sinjenik tümöreri olan fareler, her grubun ortalama tümör hacminin esas itibarıyla aynı olacağı şekilde, her biri 8 fare içeren tedavi gruplarına randomize edildi. Örnek 5'te açıklandığı gibi PEGPH20 veya Aktif Farmasötik Bileşen (API) tamponu (10 mM histidin, 130 mM NaCl, pH 6.5) 0, 3, 7, 10, 14, 17 ve 21. günler intravenöz (IV) yolla uygulandı ve anti-PD-1 (BioXCell Inc, klon RMP1-14, Kat. No. BE0146) veya salin 1, 4, 8, 11, 15 ve

18. günler intraperitonal (IP) yolla uygulandı (hepsi Tablo 23'te belirtilen doz seviyelerinde). Tümör hacimleri 0, 3, 7, 10, 14, 17 ve 21. günler ölçüldü.

Tablo 23. PEGPH20 ve anti-PD-1 Tedavi Koşulları

Grup	n	Tedavi 1	PEGPH20 dozu (mg/kg)	Tedavi 2	IG dozu (mg/kg)
1	8	API tampon	0*	Salin	0
2	8	PEGPH20	1*	Salin	0
3	8	API tampon	0*	anti-PD-1	4
4	8	PEGPH20	1*	anti-PD-1	4
* PEGPH20 veya API tampon anti-PD-1 dozundan 24 saat önce uygulandı.					

Sonuçlar Tablo 24'te sunulmaktadır. Tümör büyümesi inhibisyonu (TGI) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: 1-(tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$)/(tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$) x %100. Sonuçlar, tek başına PEGPH20 uygulanan kontrol hayvanlarında (2. Grup) tümörlerin büyümesinin anlamlı bir şekilde azalarak (1. Gruba göre $p < 0.0001$) çalışma tamamlandığında taşıyıcıyla tedavi edilen tümörlerin (1. Grup) büyüklüğünün yaklaşık yarısına geldiğini göstermektedir. 4 mg/kg anti-PD-1'le tedavi edilen hayvanlarda (3. Grup) tümörlerin büyümesi hemen hemen tamamen inhibe oldu ($p < 0.0001$) ve 1 mg/kg dozunda PEGPH20'nin 4 mg/kg anti-PD-1'den 24 saat önce uygulanması (4. Grup) tek başına 4 mg/kg anti-PD-1'le karşılaştırıldığında tümör hacminde herhangi bir ek azalmayla sonuçlanmadı ($p = 0.63$).

Tablo 24. Sonuçlar

Grup	Tedavi	Tümör Hacmi (mm^3), Ortalama ± SEM			
		0. Gün	3. Gün	7. Gün	10. gün
1	API tampon* + salin	129 ± 11	242 ± 13	353 ± 23	435 ± 33
2	1 mg/kg PEGPH20* + salin	124 ± 7	179 ± 17	275 ± 16	320 ± 25
3	API tampon* + 4 mg/kg α-PD-1	130 ± 8	198 ± 17	262 ± 32	223 ± 22
4	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg α-PD-1	128 ± 9	153 ± 14	188 ± 23	205 ± 19

Grup	Tedavi	Tümör Hacmi (mm^3), Ort. ± SEM			TGI
		14. Gün	17. Gün	21. Gün	
1	API tampon* + salin	688 ± 65	1068 ± 116	1930 ± 215	-
2	1 mg/kg PEGPH20* + salin	493 ± 40	784 ± 58	1168 ± 102	%42
3	API tampon* + 4 mg/kg α-PD-1	181 ± 27	211 ± 52	222 ± 75	%95
4	1 mg/kg PEGPH20* + 4 mg/kg α-PD-1	233 ± 34	272 ± 90	422 ± 142	%84
*API tampon veya PEGPH20, anti-PD-1 veya salin dozundan 24 saat önce uygulandı.					

B. Tedavi Farklı Tümör Büyüklüklerinde Başlatıldığında PEGPH20 Ön Uygulaması ve Düşük anti-PD-1 Dozu,

Ortalama tümör hacmi 138 ± 24 mm^3 olmak üzere yüksek HA içerikli MH194+PSC4 sinjenik tümörleri olan fareler, her grubun oralama tümör hacminin esas itibarıyla aynı olacağı şekilde, her biri 8 fare içeren tedavi gruplarına randomize edildi. Örnek 5'te açıklandığı gibi PEGPH20 veya Aktif Farmasötik Bileşen (API) tamponu (10 mM histidin, 130 mM NaCl, pH 6.5) 0 (sadece 1-4. gruplar), 3 (sadece 1-7. gruplar), 7, 10, 14, 17 ve 21. günler intravenöz (IV) yolla uygulandı ve anti-PD-1 (BioXCell Inc, klon RMP1-14, Kat. No. BE0146) veya sıçan IgG2a (BioXCell Inc, Kat. No. BE0089) izotip kontrolü 1 (sadece 1-4. gruplar), 4 (sadece 1-7. gruplar), 8, 11, 15 ve 18. günlerde intraperitonal (IP) yolla uygulandı (hepsi Tablo 23'te belirtilen doz seviyelerinde). Tablo 25'te 8-10. gruplar için gösterilen dışında, tümör hacimleri 0, 3, 7, 10, 14, 17 ve 21. günler ölçüldü.

Tablo 25. PEGPH20 ve anti-PD-1 Tedavi Koşulları					
Grup	**n**	**Tedavi 1**	**PEGPH20 dozu (mg/kg)**	**Tedavi 2**	**IG dozu (mg/kg)**
1	8	API tampon	0*	Sıçan IgG2a	2
2	8	PEGPH20	1*	Sıçan IgG2a	2
3	8	API tampon	0*	anti-PD-1	2
4	8	PEGPH20	1*	anti-PD-1	2
5**	8	PEGPH20	1*	Sıçan IgG2a	2
6**	8	API tampon	0*	anti-PD-1	2
7**	8	PEGPH20	1*	anti-PD-1	2
8***	8	PEGPH20	1*	Sıçan IgG2a	2
9***	8	API tampon	0*	anti-PD-1	2
10***	8	PEGPH20	1*	anti-PD-1	2
* PEGPH20 veya API tampon anti-PD-1 dozundan 24 saat önce uygulandı.					
** Tedavi, tümör büyüklüğü ortalaması yaklaşık 300 mm^3 olana kadar (çalışmanın 3. günü) geciktirildi.					
*** Tedavi, tümör büyüklüğü ortalaması yaklaşık 400 mm^3 olana kadar (çalışmanın 7. günü) geciktirildi.					

Sonuçlar Tablo 26'da sunulmaktadır. Tümör büyümesi inhibisyonu (TGI) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: 1-(tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, test ürünü$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$)/(tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{son gün})}$-tümör hacmi, taşıyıcı$_{(\text{başlangıç ölçümü})}$) x %100. Tedavi 0. çalışma gününde başlatıldığında, sonuçlar, tek başına PEGPH20 (2. Grup) veya tek başına anti-PD-1 (3. Grup) uygulanan hayvanlarda tümörlerin büyümesinin anlamlı bir şekilde azalarak (1. Gruba göre sırasıyla $p = 0.0021$ ve <0.0001) çalışma tamamlandığında taşıyıcıyla tedavi edilen tümörlerin (1. Grup) büyüklüğünün yaklaşık yarısına indiğini gösterdi. PEGPH20'nin 1 mg/kg dozunda 2 mg/kg anti-PD-1'den 24 saat önce uygulanması (4. Grup) tek başına 2 mg/kg anti-PD-1'le karşılaştırıldığında tümör hacminde herhangi bir ek azalmayla sonuçlanmadı ($p = 0.07$). Tedavi 3. çalışma gününde başladığında (5-7. Gruplar), anti-PD-1'in tümör büyümesi üzerinde hâlâ anlamlı bir

inhibitör etkisi vardı ($p < 0.0001$) ve yine PEGPH20'nin varlığında hiçbir ek etki gözlemlenmedi. Son olarak, tedavi 7. çalışma gününde başlatıldığında (8-10. Gruplar), tek başına anti-PD-1 veya tek başına PEGPH20'nin artık anlamlı bir etkisi yoktu ($p = 0.70$) ve kombinasyonun etkisi tek başına PEGPH20'ninkinden anlamlı olarak farklı değildi ($p = 0.45$). Dolayısıyla, PEGPH20 bu tümör modelinde anti-PD-1'in etkinliğini arttırmadı.

Tablo 26. Sonuçlar

Grup	Tedavi	Tümör Hacmi (mm^3), Ortalama ± SEM			
		0. Gün	**3. Gün**	**7. Gün**	**10. gün**
1	API tampon* + 2 mg/kg sıçan IgG2a	137 ± 7	308 ± 19	418 ± 36	559 ± 56
2	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg sıçan IgG2a	138 ± 4	225 ± 14	336 ± 24	447 ± 29
3	API tampon* + 2 mg/kg α-PD-1	140 ± 10	265 ± 26	384 ± 56	437 ± 78
4	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-1	142 ± 12	200 ± 18	237 ± 30	218 ± 15
5**	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg sıçan IgG2a	135 ± 8	245 ± 24	332 ± 20	389 ± 31
6**	API tampon* + 2 mg/kg α-PD-1	137 ± 9	278 ± 14	335 ± 20	310 ± 20
7**	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-1	136 ± 11	291 ± 16	280 ± 20	379 ± 34
8***	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg sıçan IgG2a	138 ± 10	ölçülmedi	418 ± 44	424 ± 53
9***	API tampon* + 2 mg/kg α-PD-1	138 ± 9		429 ± 27	570 ± 52
10***	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-1	136 ± 8		382 ± 47	371 ± 37

Grup	Tedavi	Tümör Hacmi (mm^3), Ort. ± SEM			TGI
		14. Gün	**17. Gün**	**21. Gün**	

1	API tampon* + 2 mg/kg sıçan IgG2a	868 ± 78	1209 ± 147	2196 ± 215	-
2	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg sıçan IgG2a	538 ± 45	716 ± 44	1317 ± 75	%43
3	API tampon* + 2 mg/kg α-PD-1	471 ± 77	554 ± 97	1063 ± 249	%55
4	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-1	309 ± 33	407 ± 59	775 ± 133	%69
5**	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg sıçan IgG2a	617 ± 59	819 ± 74	1589 ± 158	%29
6**	API tampon* + 2 mg/kg α-PD-1	345 ± 40	442 ± 78	797 ± 148	%68
7**	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-1	458 ± 37	574 ± 64	1033 ± 129	%57
8***	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg sıçan IgG2a	648 ± 63	867 ± 164	1349 ± 224	%41
9***	API tampon* + 2 mg/kg α-PD-1	817 ± 74	1150 ± 132	1875 ± 221	%16
10***	1 mg/kg PEGPH20* + 2 mg/kg α-PD-1	566 ± 61	772 ± 108	1132 ± 158	%52
*APl tampon veya PEGPH20, anti-PD-1 veya izotip kontrolü dozundan 24 saat önce uygulandı.					
** Tedavi, tümör büyüklüğü ortalaması yaklaşık 300 mm^3 olana kadar (çalışmanın 3. günü) geciktirildi.					
*** Tedavi, tümör büyüklüğü ortalaması yaklaşık 400 mm^3 olana kadar (çalışmanın 7. günü) geciktirildi.					

Örnek 10

Anti-PD-1 antikorunun ve Önceden Uygulanan Deksametazonun Sinjenik MH194+PSC4 Tümörü Fare Modelindeki Etkisi

Ortalama tümör hacmi 131 ± 26 mm^3 olmak üzere, Örnek 1C'de açıklandığı gibi oluşturulan parental MH194+PSC4 sinjenik tümörleri olan fareler, her grubun ortalama tümör hacminin esas itibarıyla aynı olacağı şekilde, her biri 6 fare içeren tedavi gruplarına randomize edildi. Deksametazon veya salin (enjeksiyon için %0.9 sodyum klorür) 0, 3, 7, 10, 14 ve 17. günler intraperitonal (IP) olarak uygulandı ve anti-PD-1 (BioXCell Inc, klon RMP1-14, Kat. No. BE0146) veya salin 1, 4, 8, 11, 15 ve 18. günler intraperitonal (IP) olarak uygulandı (hepsi Tablo 27'de belirtilen doz seviyelerinde). Tümör hücimleri 0, 3, 7, 10, 14, 17 ve 21. günler ölçüldü. Kas-iskelet rahatsızlığını azaltmak için PEGPH20'nin deksametazonla birlikte uygulandığı klinik çalışmalar için beşeri doz eşdeğerine yaklaşmak üzere orta deksametazon doz seviyesi (3 mg/kg) seçildi.

Tablo 27. Deksametazon ve anti-PD-1 Tedavi Koşulları

Grup	n	Tedavi 1	Deksametazon dozu (mg/kg)	Tedavi 2	IG dozu (mg/kg)
1	6	Salin	0*	Salin	0
2	6	Salin	0*	anti-PD-1	4
3	6	Deksametazon	1*	Salin	0
4	6	Deksametazon	3*	Salin	0
5	6	Deksametazon	5*	Salin	0
6	6	Deksametazon	1*	anti-PD-1	4
7	6	Deksametazon	3*	anti-PD-1	4
8	6	Deksametazon	5*	anti-PD-1	4

* Deksametazon veya salin kontrol anti-PD-1 dozundan 24 saat önce uygulandı.

Sonuçlar Tablo 28'de sunulmaktadır. Tümör büyümesi inhibisyonu (TGI) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: 1-(tümör hacmi, test ürünü$_{(son\ gün)}$-tümör hacmi, test ürünü$_{(başlangıç\ ölçümü)}$)/(tümör hacmi, taşıyıcı$_{(son\ gün)}$-tümör hacmi, taşıyıcı$_{(başlangıç\ ölçümü)}$) x %100. Sonuçlar, 4 mg/kg dozunda anti-PD-1'le tedavi edilen hayvanlarda (2. Grup) tümörlerin büyümesinin

kabaca 2/3 oranında inhibe olduğunu gösterdi ($p < 0.0001$), deksametazon ise sadece test edilen en yüksek doz olan 5 mg/kg'de tümör büyümesini anlamlı bir şekilde inhibe etti ($p = 0.0009$). Deksametazonun 1 ila 5 mg/kg aralığındaki dozlarda, 4 mg/kg anti-PD-1'den 24 saat önce uygulanması (4. Grup) anti-PD-1'in etkisini değiştirmedi (tek başına anti-PD-1'e göre 1, 3 ve 5 mg/kg dozunda deksametazon artı anti-PD-1 için sırasıyla $p = 0.12$, 0.65 ve 0.70).

Tablo 28. Sonuçlar

Grup	Tedavi	Tümör Hacmi (mm^3), Ortalama ± SEM			
		0. Gün	3. Gün	7. Gün	10. gün
1	Salin* + Salin	135 ± 17	307 ± 36	449 ± 63	596 ± 72
2	Salin* + 4 mg/kg α-PD-1	132 ± 10	340 ± 41	361 ± 56	316 ± 54
3	1 mg/kg Dex* + Salin	133 ± 8	240 ± 19	374 ± 39	581 ± 50
4	3 mg/kg Dex* + Salin	133 ± 9	253 ± 17	436 ± 23	553 ± 63
5	5 mg/kg Dex* + Salin	125 ± 10	251 ± 22	390 ± 46	462 ± 46
6	1 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α-PD-1	126 ± 10	253 ± 38	283 ± 51	203 ± 45
7	3 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α-PD-1	134 ± 10	218 ± 26	342 ± 59	350 ± 86
8	5 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α-PD-1	135 ± 13	277 ± 36	345 ± 41	320 ± 75

Grup	Tedavi	Tümör Hacmi (mm^3), Ort. ± SEM			TGI
		14. Gün	17. Gün	21. Gün	
1	Salin* + Salin	981 ± 169	1431 ± 135	2316 ± 247	-
2	Salin* + 4 mg/kg α-PD-1	384 ± 80	574 ± 159	840 ± 270	%68
3	1 mg/kg Dex* + Salin	904 ± 81	1354 ± 147	1899 ± 155	%19
4	3 mg/kg Dex* + Salin	759 ± 81	1346 ± 109	1867 ± 130	%21
5	5 mg/kg Dex* + Salin	729 ± 77	1202 ± 118	1630 ± 126	%31
6	1 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α-PD-1	231 ± 59	271 ± 127	319 ± 155	%91
7	3 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α-PD-1	348 ± 90	468 ± 196	642 ± 277	%77
8	5 mg/kg Dex* + 4 mg/kg α-PD-1	364 ± 107	493 ± 197	659 ± 247	%76
*Deksametazon (Dex) veya salin anti-PD-1 veya salin dozundan 24 saat önce uygulandı.					

Örnek 11

Alexa Fluor 488 (AF488) ile İşaretlenmiş Anti Beşeri CTLA4, PD-1 ve PD-L1 Antikorlarının Oluşturulması

Anti beşeri PD-L1 antikoru (G&P Biosciences, Kat. No. MAB0199), anti beşeri PD-1 antikoru (G&P Biosciences, Kat. No. MAB1732) ve anti beşeri CTLA4 antikorunu (G&P Biosciences, Kat. No. MAB1718) işaretlemek için Alexa Fluor 488 (AF488) protein işaretleme kiti (Life Technologies, Kat. No. A-10235) kullanıldı.

İşaretleme imalatçının talimatlarına göre yapıldı. Bir 1 M sodyum bikarbonat çözeltisi hazırlandı ve hazırlanmış çözeltiden 100 µL 1 mL 1 mg/mL antikora (toplam 1 mg antikor) ilave edildi. Bu karışım imalatçı tarafından tedarik edilen bir tüp AF488 reaktif boyaya ilave edildi. Reaksiyon karışımı nazikçe sallanarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

AF488-anti-PD-L1, AF488-anti-PD-1 ve AF488-anti-CTLA4 adı verilen ve bir grup olarak AF488-antikor olarak adlandırılan AF488'le işaretlenmiş anti beşeri antikorlar, Bio-Rad

mikro Bio-spin 6 kolon (Bio-Rad, Kat. No. 732-6621) kullanılarak ayrıldı. Toplam protein konsantrasyonu Pierce BCA protein tahlil kitiyle (Pierce, Kat. No. 23227) belirlendi.

Örnek 12

Hiyalüronidazın anti beşeri PD-L1, anti beşeri CTLA4 ve anti beşeri PD-1 üzerindeki etkisi: Yüksek HA içerikli Ksenogreft Tümörü Fare Modeline Erişebilirlik

HA içeriği yüksek SKOV3/HAS2 ksenogreft tümörleri olan fareler Örnek 2'de açıklandığı gibi oluşturuldu ve tek başına Örnek 5'te açıklanan PEGPH20 ile ve AF488-anti-PD-L1, -PD-1 veya -CTLA4 kombinasyonuyla (Örnek 9'da açıklandığı gibi) aşağıdaki gibi tedavi edildi:

Ortalama tümör hacmi 500 mm^3 olmak üzere yüksek HA içerikli ksenogreft tümörleri olan fareler, her grubun ortalama tümör hacminin esas itibarıyla aynı olacağı şekilde, her biri 4 fare içeren tedavi gruplarına randomize edildi. Tedaviler aşağıda Tablo 29'da açıklandığı gibi bir kez uygulandı. Örnek 7'de açıklandığı gibi AF488-antikor veya Aktif Farmasötik Bileşen (API) tamponu (10 mM histidin, 130 mM NaCl, pH 6.5) veya PEGPH20 (Örnek 5'te açıklandığı gibi) ve AF488-antikor, hepsi belirtilen doz seviyelerinde olmak üzere intravenöz (IV) yolla uygulandı. Tümörler tedaviden 48 saat sonra toplandı ve bir Bio-Rad Chemidoc MP Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad) kullanılarak görüntülendi.

Tablo 29. PEGPH20 ve anti beşeri PD-L1 Tedavi Koşulları

Grup	n	Tedavi 1	PEGPH20 dozu (mg/kg)	Tedavi 2	IG dozu (mg/kg)
1	4	API tampon	0	Salin	0
2	4	API tampon	0	AF488-anti-PD-L1	1
3	4	PEGPH20	0.0375	AF488-anti-PD-L1	1
4	5	API tampon	0	AF488-anti-PD-1	1
5	5	PEGPH20	0.0375	AF488-anti-PD-1	1
6	5	API tampon	0	AF488-anti-CTLA4	1
7	5	PEGPH20	0.0375	AF488-anti-CTLA4	1

Sonuçlar Tablo 30'da (pozitif piksel sayımı) ve Tablo 31'de (ortalama floresan yoğunluğu) sunulmaktadır. Piksel sayımları ve floresan yoğunluğu Image Pro (MediaCybernetics

Image Pro Analyzer 7.0) yazılımı kullanılarak elde edildi ve AF488-antikor enjekte edilmemiş hayvanlardan alınan tümörlerden ortalama zemin değer çıkarıldı. Sonuçlar, tek başına AF488-antikor uygulanan hayvanlarda (2, 4 ve 6. Gruplar) tümörlerde floresanın saptanabildiğini gösterdi. Floresan yoğunluğu PEGPH20 ve AF488-anti-PD-L1 kombinasyonuyla tedavi edilen hayvanlardaki (3. Grup) tümörlerde anlamlı bir şekilde arttı. Öte yandan PEGPH20 olmadan sadece AF488-PD-1 veya -CTLA4'le tedavi edilen hayvanlarla (5 ve 7. Gruplar) hayvanlarla karşılaştırıldığında PEGPH20 ve AF488-anti-PD-1 veya AF488-anti-CTLA4'le tedavi edilen hayvanlarda floresan yoğunluğunda hiçbir artış gözlemlenmedi. Dolayısıyla sonuçlar PEGPH20 ve anti beşeri PD-L1 kombinasyon tedavisinin, anti-PD-L1'e özgü bir şekilde anti-PD-L1'in HA içeriği yüksek tümörlere erişebilirliğini arttırdığını göstermektedir.

Tablo 30. Sonuçlar: Pozitif Piksel Sayımı

Grup	Tedavi 1	Pozitif Piksel Sayımı; ortalama ± SEM
1	API tampon	0
2	AF488-anti-PD-L1	320 ± 44
3	PEGPH20 + AF488-anti-PD-L1	884 ± 123
4	AF488-anti-PD-1	1014 ± 80
5	PEGPH20 + AF488-anti-PD-1	877 ± 73
6	AF488-anti-CTLA4	607 ± 86
7	PEGPH20 + AF488-anti-CTLA4	719 ± 121

Tablo 31. Sonuçlar - Ortalama Floresan Yoğunluğu

Grup	Tedavi 1	Floresan Yoğunluğu; ortalama ± SEM
1	API tampon	0
2	AF488-anti-PD-L1	5,847 ± 1,306
3	PEGPH20 + AF488-anti-PD-L1	15,074 ± 1,817
4	AF488-anti-PD-1	5,128 ± 797
5	PEGPH20 + AF488-anti-PD-1	4,177 ± 981
6	AF488-anti-CTLA4	7,384 ± 1,019
7	PEGPH20 + AF488-anti-CTLA4	7,645 ± 1,847

Örnek 13

Çok Veziküllü Lipozom (MVL) PH20 Formülasyonları

Sistemik uygulama için, çözünür hiyalüronidazlar da dâhil olmak üzere hiyalüronidazlar lipozomlar gibi lipit vezikülleri içinde hazırlanabilir. Bunların örnekleri çok veziküllü lipozomlardır (MVL). Çeşitli uzatılmış salımlı çok veziküllü lipozom PH20 (MVL-PH20) formülasyonları, aşağıdaki genel prosedür kullanılarak hazırlandı; ayrıca Uluslararası PCT Başvurusu No. WO 2012/109387 ve ABD Yayını US-2013-0251786-A1'e bakınız. Lipit çözeltileri çeşitli trigliseritler (TG) triolein ($C_{18:1}$), trikaprilin ($C_{8:0}$) ve kolesterol de dâhil olmak üzere çeşitli nötr lipitlerin ve fosfatidilkolinler (PC), dioleoilfosfatidilkolin (DOPC, $C_{18:1}$), dierukoil fosfatidilkolin (DEPC, $C_{22:1}$) ve dipalmitoil fosforilgliserol (DPPG, $C_{16:1}$) dâhil olmak üzere hem pozitif hem negatif yüklü lipitlerin karışımlarını içeriyordu. Toplam PC konsantrasyonu 19.8 mM'ye kadardı, kolesterol konsantrasyonu 30 mM'ydi, TG konsantrasyonu 3.9 mM'ye kadardı ve DPPG konsantrasyonu 4.2 mM'ydi.

A. MVL-PH20 Formülasyonlarının Oluşturulması

Değişen mol yüzdeleriyle DEPC ve DOPC (%0-100) ve değişen mol yüzdeleriyle triolein ve trikaprilin (%0-100), DPPG, kolesterol ve 0.1, 0.25, 0.5, 1 veya 2 mg/mL PH20 içeren MVL formülasyonları hazırlandı. İlk aşamada, kloroform içinde lipitler (yağ fazı) ve bir ilk sulu çözelti içinde PH20 (su fazı) birleştirildi ve emülsifiye edilerek, PH20'nin fosfolipit tek tabakası tarafından sarmalandığı bir yağ içinde su emülsiyonu oluşturuldu. İkinci aşamada, ikinci bir sulu çözelti ilave edildi ve emülsifiye edilerek bir su içinde yağ içinde su emülsiyonu oluşturuldu. İkinci sulu çözeltinin ikinci bir temsili miktarının ilave edilmesinden sonra, kloroform çözücü buharlaştırıldı ve çok veziküllü lipozomlar içeren oluşan ürün üçüncü bir sulu çözelti içinde birkaç kez yıkandı ve yaklaşık %50 lipokritte (paketlenmiş parçacık hacmi) yeniden süspansiyon haline getirildi ve 2-8°C'de saklandı.

Örnek formülasyonlar bir mini vorteks kullanılarak hazırlandı veya bir Omni mikser (Omni Macro ES, Omni International, Kennesaw, GA) kullanılarak daha büyük bir ölçekte hazırlandı. İkinci, Omni mikser usulünde, kloroform (6 mL) içindeki lipit çözeltisi 8 dakika bir Omni Mikserle 7,000 devir/dakikada, 6 mL ilk sulu çözeltiyle (10 mM His-HCl, pH 6.5, değişen konsantrasyonlarda PH20 ihtiva eden %5 sükroz içerir) emülsifiye edilerek bir yağ içinde su emülsiyonu oluşturuldu. 40 mM lizin, pH 10.0 içeren %3.2 glukozun ikinci bir sulu çözeltisiyle (20 mL) 1-3 dakika 4500 devir/dakika sonraki emülsifikasyon bir su içinde yağ içinde su emülsiyonuyla sonuçlandı. İkinci emülsiyon iki

Erlenmeyer şişesine eşit olarak bölüştürüldü ve her iki şişeye ikinci sulu çözeltinin 50 mL'lik başka bir temsili miktarı ilave edildi. Kloroform, azot 35°C'de emülsiyonun yüzeyi üzerine fışkırtılarak giderildi. PH20 içeren MVL parçacıkları, çözelti ilave edilerek, santrifüj tüpü ters çevirmeyle karıştırılarak ve soğutulmuş bir tezgâh üstü santrifüjde 10 dakika 4°C'de 3500 devir/dakikada santrifüjden geçirilerek üç kez 50 mL üçüncü sulu çözeltiyle (120 mM NaCl içeren 25 mM His-HCl tampon, pH 6.0) yıkandı. Son olarak, MVL parçacıkları üçüncü sulu çözelti içinde yeniden süspansiyon haline getirilerek, yaklaşık %50 lipokrit formülasyonu oluşturuldu ve 2-8°C'de soğutulmuş halde saklandı. Mini vorteks prosedürü, Tablo 30'da verilen parametreler kullanıldığında benzerdi.

Aşağıda Tablo 32'de ilk, ikinci ve üçüncü sulu çözeltiler özetlenmektedir. Tablo 32'de ayrıca MVL işleminin her aşamasının hacimleri, tepkime maddesi konsantrasyonları ve diğer parametreleri özetlenmektedir.

Tablo 32. MVL-PH20 formülasyonu ve işlem parametreleri					
1. Sulu Çözelti	%5 sükroz içeren 10 mM His-HCl, pH 6.5				
2. Sulu Çözelti	%3.2 glukoz içeren 40 mM lizin, pH 10.0				
3. Sulu Çözelti	120 mM NaCl içeren 25 mM His-HCl tampon, pH 6.0				
1. Emülsiyon Karıştırma	**Vorteks Mikser**		**Omni Mikser**		
1. çözelti içinde PH20	600 µL		6 mL		
Kloroform içinde Lipit Çözeltisi	600 µL		6 mL		
Toplam Hacim	1.2 mL		12 mL		
1. Emülsifikasyon Hızı	Maksimum devir/dakika		7000 devir/dakika		
Süre	8 dakika		8 dakika		
Başlangıç PH20 protein konsantrasyonu (aktivite)	0.25 mg/mL (30,000 U/mL)	0.5 mg/mL (60,000 U/mL)	0.5 mg/mL (60,000 U/mL)	1.0 mg/mL (120,000 U/mL)	2.0 mg/mL (240,000 U/mL)
PC	15.8-19.8 mM		15.8-19.8 mM		
Kolesterol	30 mM		30 mM		
TG	3.75-3.9 mM		3.75-3.9 mM		
DPPG	4.2 mM		4.2 mM		
Bıçak Tipi 1	Uygulanamaz		Yanları keskin		
Bıçak Tipi 2	Uygulanamaz		Yanları ve içi keskin		

Bıçak Tipi 3	Uygulanamaz	Her tarafı düz, keskin değil
2. Emülsiyon Karıştırma	**Vortek Mikser**	**Omni Mikser**
2. Sulu Çözelti	2.5 mL	20 mL
Toplam Hacim	3.7 mL	32 mL
Hız	Maksimum devir/dakika	4500 devir/dakika
Süre	15 saniye	1-3 dakika
Çözücü Buharlaştırma	**Vorteks Mikser**	**Omni Mikser**
2. Sulu Çözelti	10 mL	100 mL
Toplam Hacim	13.7 mL	132 mL
Su Banyosu Çalkalama Hızı	100-130 devir/dakika	100-130 devir/dakika
Süre	11 dakika	15 dakika
Sıcaklık	35°C	35°C
Yıkama, tampon değişimi ve yeniden süspansiyon haline getirme	**Vorteks Mikser**	**Omni Mikser**
Numune	Numunenin Tamamı	17 mL
3. Sulu Çözelti	50 mL	50 mL
Toplam Hacim	50 mL	200 mL
Santrifüj Hızı	3500 devir/dakika	3500 devir/dakika

Süre	10 dakika	10 dakika
Yıkama Sayısı	3	3
Yeniden Süspansiyon Hacmi	0.3-0.5 mL	3-5 mL
LİPOKRİT	**Vorteks Mikser**	**Omni Mikser**
Pelet hacmi	Değişir	Değişir
3. Sulu Çözelti	Değişir	Değişir
Hız	3500 devir/dakika	3500 devir/dakika
Süre (dakika)	10 dakika	10 dakika
Çözelti + Pelet Hacmi	Değişir	Değişir ~%50
Lipokrit %'sinin Ayarlandığı nokta	~%50	~%50

B. Örnek MVL-PH20 Formülasyonlarının Özeti

Değişen molar oranlarda lipitler, PH20 ve başka katı maddeleri içeren çeşitli MVL-PH20 formülasyonları, yukarıda açıklananla aynı genel prosedürler kullanılarak hazırlandı. Çeşitli ek katkı maddeleri kapsüllenmiş PH20'nin stabilitesini arttırmak ve korumak için 1. sulu çözeltiye dâhil edidi. Örneğin, F68 ve F69 formülasyonları kalsiyum klorür içeriyordu. Formülasyon F82, 600 µL kloroform fazı ile 600 µL ilk sulu çözelti fazını ayıran bir ara faz olarak 150 µL gliserol içeriyordu. Formülasyon F83, %0.1 dekstran 40,000 ve %0.1 PEG-6000 içeriyordu. Formülasyon F85-F87 hiyalüronik asit (HA) oligomerleri içeriyordu. Formülasyonların karıştırma/emülsifikasyon prosedürleri farklıydı. Örneğin formülasyon F66 için, ilk emülsifikasyon aşaması 8 dakika yerine 4 dakika uygulanarak daha küçük lipozomal peletler oluşturuldu. Formülasyon F67, karıştırma sırasında daha az kesme uygulamak için bir mini vorteks yerine bir rotor çarkıyla karıştırıldı.

Aşağıda Tablo 33'te, formülasyon numarası, formülasyon PC (fosfatidilkolin) ve TG (trigliserit) mol olarak % oranları, mg/mL olarak başlangıç PH20 konsantrasyonu, emülsiyonları hazırlamak için kullanılan mikser ve ilk sulu çözeltiye dâhil edilen katkı maddeleri dâhil olmak üzere çeşitli MVL-PH20 formülasyonları verilmektedir.

Tablo 33. PH20 ile MVL Formülasyonları

Formülasyon	Formülasyon PC ve TG mol % oranı	Başlangıç PH20 konsantrasyonu mg/mL	Mikser	İlk Sulu Çözeltideki Katkı Maddeleri
F40	Triolein içeren DEPC	0.25	Mini Vorteks	N/A
F41	Triolein içeren DEPC	0	Mini Vorteks	N/A
F42	Triolein içeren DEPC	0.25 floresanla işaretlenmiş	Mini Vorteks	AlexaFluor 488'le işaretli PH20
F53	25/75 DEPC/DOPC; 25/75 Triolein/Trikap	0.25	Mini Vorteks	N/A
F54	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.25	Mini Vorteks	N/A
F55	75/25 DEPC/DOPC; 75/25 Triolein/Trikap	0.25	Mini Vorteks	N/A
F56	90/10 DEPC/DOPC; 90/10 Triolein/Trikap	0.25	Mini Vorteks	N/A
F61	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.25	Omni	N/A

Tablo 33. PH20 ile MVL Formülasyonları

Formülasyon	Formülasyon PC ve TG mol % oranı	Başlangıç PH20 konsantrasyonu mg/mL	Mikser	İlk Sulu Çözeltideki Katkı Maddeleri
F66	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.25	Mini Vorteks[1]	N/A
F67	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.25	Rotor Çarkı	N/A
F68	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.25	Mini Vorteks	20 mM $CaCl_2$
F69	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.25	Mini Vorteks	10 mM $CaCl_2$
F70	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.0	Omni	N/A
F71	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.25	Omni	N/A

Tablo 33. PH20 ile MVL Formülasyonları				
Formülasyon	**Formülasyon PC ve TG mol % oranı**	**Başlangıç PH20 konsantrasyonu mg/mL**	**Mikser**	**İlk Sulu Çözeltideki Katkı Maddeleri**
F72	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.5	Omni	N/A
F73	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.5	Omni	N/A
F74	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	N/A
F75	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	2.0	Omni	N/A
F77[2]	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	
F78	Triolein içeren DEPC	1.0	Omni	N/A
F79	Triolein içeren DEPC	1.0	Omni	N/A

Tablo 33. PH20 ile MVL Formülasyonları

Formülasyon	Formülasyon PC ve TG mol % oranı	Başlangıç PH20 konsantrasyonu mg/mL	Mikser	İlk Sulu Çözeltideki Katkı Maddeleri
F80	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	N/A
F81	Triolein içeren DEPC	0.5	Omni	N/A
F82	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	0.5	Mini Vorteks	ara faz olarak 150 µL Gliserol
F83	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	%0.1 Dekstran 40,000 %0.1 PEG-6000
F84	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni[3]	N/A
F85	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	15 mg/mL HA 74,000
F85R1	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	15 mg/mL HA 74,000

Tablo 33. PH20 ile MVL Formülasyonları

Formülasyon	Formülasyon PC ve TG mol % oranı	Başlangıç PH20 konsantrasyonu mg/mL	Mikser	İlk Sulu Çözeltideki Katkı Maddeleri
F86	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	50 mg/mL HA 74,000
F87	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	100 mM Prolin
F88	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	100 mM Arg-HCl, pH 6.44
F89	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	%6 Sorbitol
F90	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 Triolein/Trikap	1.0	Omni	%6 Trehaloz

[1]Daha kısa ilk emülsiyon karıştırma süresi (4 dakika)

[2]Lipit çözeltisinde bitki türevli kolesterol yerine hayvan türevli kolesterol kullanıldı

[3]Daha kısa ilk emülsiyon karıştırma süresi (4 dakika) ve daha kısa ikinci emülsiyon karıştırma süresi (30 saniye)

Örneklerin modifikasyonları bu alanda uzman olanlar için açık olacaktır. Dolayısıyla, bu buluş sadece ilişikteki istemlerin çerçevesiyle sınırlanacaktır.

DİZİ LİSTESİ

<110> Halozyme, Inc.

Rosengren, Sanna

Thompson, Curtis B.

Shepard, H. Michael

<120> BİR HİYALÜRONAN AYRIŞTIRICI ENZİM VE BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ KONTROL NOKTASI İNHİBİTÖRÜYLE KOMBİNASYON TERAPİSİ

<130> 33320.03122.WO01/3122PC

<140> Henüz Devredilmemiş

<141> İlişikte

<150> US 62/043,351

<151> 2014-08-28

<160> 320

<170> Windows için FastSEQ Versiyon 4.0

<210> 1

<211> 10836

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> pLV-EF1a-hHAS3-1RES-Hyg

<400> 1

aagcttaatg tagtcttatg caatactctt gtagtcttgc aacatggtaa cgatgagtta 60
gcaacatgcc ttacaaggag agaaaaagca ccgtgcatgc cgattggtgg aagtaaggtg 120
gtacgatcgt gccttattag gaaggcaaca gacgggtctg acatggattg gacgaaccac 180
tgaattgccg cattgcagag atattgtatt taagtgccta gctcgataca taaacgggtc 240
tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300
taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg 420
cgcccgaaca gggacttgaa agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa 540
attttgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg 600
gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cggttaaggc cagggggaaa gaaaaaatat 660
aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc 720
ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
caaaggatag agataaaaga caccaaggaa gctttagaca agatagagga agagcaaaac 900
aaaagtaaga ccacgcgcca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
agtagcaccc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat 1140
gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat 1320
ttggggttgc tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag 1380
taataaatct ctggaacaga tttggaatca cacgacctgg atggagtggg acagagaaat 1440
taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
aacaaattgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
atcgtttcag acccacctcc caacccccgag gggacccgac aggcccgaag gaatagaaga 1740
agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctcgacggta 1800

tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tgggggtac agtgcagggg aaagaatagt 1860
agacataata gcaacagaca tacaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaattcaa 1920
aattttatcg atgcctcccc gtcaccaccc cccccaaccc gccccgaccg gagctgagag 1980
taattcatac aaaaggactc gcccctgcct tggggaatcc cagggaccgt cgttaaactc 2040
ccactaacgt agaacccaga gatcgctgcg ttccogcccc ctcaccogcc cgctctcgtc 2100
atcactgagg tggagaagag catgcgtgag gctccggtgc cogtcagtgg gcagagcgca 2160
catcgcccac agtcccgag aagttggggg gaggggtogg caattgaacc ggtgcctaga 2220
gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagtg atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg 2280
agggtggggg agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg 2340
ggtttgccgc cagaacacag gtaagtgccg tgtgtggttc cogcgggcct ggcctctta 2400
cgggttatgg cccttgcgtg ccttgaatta cttccacgcc cctggctgca gtacgtgatt 2460
cttgatcccg agcttcgggt tggaagtggg tgggagagtt cgaggccttg cgcttaagga 2520
gccccttcgc ctcgtgcttg agttgaggcc tggcctgggc gctggggccg ccgcgtgcga 2580
atctggtggc acctccgcgc ctgtctcgct gctttcgata agtctctagc catttaaaat 2640
ttttgatgat atcctgcgac gcttttttc tggcaagata gtcttgtaaa tgcgggccaa 2700
gatctgcaca ctggtatttc ggtttttggg gccgcgggcg gogaccgggc ccgtgcgtcc 2760
cagcgcacat gttcggcgag gcgggggcctg cgagcgcggc cacccgagaat cggacgggg 2820
tagtctcaag ctggccggcc tgctctggtg cctggcctcg cgccgccgtg tatcgccccg 2880
ccctgggcgg caaggctggc ccggtcggca ccagttgcgt gagcggaaag atggccgctt 2940
cccggccctg ctgcagggag ctcaaaatgg aggacgcggc gctcgggaga gcgggcgggt 3000
gagtcaccca cacaaaggaa aagggccttt ccgtcctcag ccgtcgcttc atgtgactcc 3060
acggagtacc gggcgccgtc cagggcccte gattagttct ogagcttttg gagtacgtcg 3120
tctttaggtt ggggggaggg gttttatgcg atggagtttc cccacactga gtgggtggag 3180
actgaagtta ggccagcttg gcacttgatg taattctcct tggaatttgc cctttttgag 3240
tttggatctt ggttcattct caagcctcag acagtggttc aaagtttttt tcttccattt 3300
caggtgtcgt gaaaactacc cctctagacc cgggccacca tgccggtgca gctgacgaca 3360
gccctgcgtg tggtgggcac cagcctgttt gccctggcag tgctgggtgg catcctggca 3420
gcctatgtga cgggctacca gttcatccac acggaaaagc actacctgtc attcggcctg 3480
tacggcgcca tcctgggcct gcacctgctc attcagagcc tgtttgcctt cctggagcac 3540
cggcgcatgc gacgtgccgg ccaggccctg aagctgccct ccccgcggcg gggctcggtg 3600
gcactgtgca ttgccgcata ccaggaggac cctgactact tgcgcaagtg cctgcgctcg 3660
gcccagcgca tctccttccc tgacctcaag gtggtcatgg tggtggatgg caaccgccag 3720
gaggacgcct acatgctgga catcttccac gaggtgctgg gcggcaccga gcaggccggc 3780
ttcttigtgt ggcgcagcaa cttccatgag gcaggcgagg gtgagacgga ggccagcctg 3840
caggagggca tggacogtgt gcgggatgtg gtgcgggcca gcaccttctc gtgcatcatg 3900
cagaagtggg gaggcaagcg cgaggtcatg tacacggcct tcaaggccct cggcgattcg 3960
gtggactaca tccaggtgtg cgactctgac actgtgctgg atccagcctg caccatcgag 4020
atgcttcgag tcctggagga ggatccccaa gtagggggag tcgggggaga tgtccagatc 4080
ctcaacaagt acgactcatg gatttccttc ctgagcagcg tgcggtactg gatggccttc 4140
aacgtggagc gggcctgcca gtcctacttt ggctgtgtgc agtgtattag tgggcccttg 4200
ggcatgtacc gcaacagcct cctccagcag ttcctggagg actggtacca tcagaagttc 4260
ctaggcagca agtgcagctt cggggatgac cggcacctca ccaaccgagt cctgagcctt 4320
ggctaccgaa ctaagtatac cgcgcgctcc aagtgcctca cagagacccc cactaagtac 4380
ctccggtggc tcaaccagca aacccgctgg agcaagtctt acttccggga gtggctctac 4440
aactctctgt ggttccatca gcaccacctc tggatgacct acgagtcagt ggtcacgggt 4500
ttcttcaact tcttcctgct gacggtgcag ctggtgggca ttatcaaggc cacctacgcc 4620
tgcttccttc ggggcaatgc agagatgatc ttcatgtccc tctactccct cctctatatg 4680
tccagcttc tgccggccaa gatctttgcc attgctacca tcaacaaatc tggctggggc 4740
acctctggcc gaaaaaccat tgtggtgaac ttcattggcc tcattcctgt gtccatctgg 4800
gtggcagttc tcctgggagg gctggcctac acagcttatt gccaggacct gttcagtgag 4860
acagagctag ccttccttgt ctctgggget atactgtatg gctgctactg ggtggccctc 4920
ctcatgctat atctggccat catcgcccgg cgatgtggga agaagccgga gcagtacagc 4980
ttggcttttg ctgaggtgta gacgcgtctc cggcctaggg ataacagggt aatcogctag 5040
cccctctccc tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat aaggccggtg 5100
tgcgtttgtc tatatgttat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg tgagggcccg 5160
gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcctagggggt ctttcccctc tgcgccaaagg 5220
aatgcaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca 5280
aacaacgtct gtagcgaccc tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg acaggtgcct 5340
ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac cccagtgcca 5400
cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg tattcaacaa 5460
ggggctgaag gatgcccaga aggtcccca ttgtatgggg tctgatctgg ggcctcggta 5520
cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaaacgt ctaggccccc cgaaccacgg 5580

```
ggacgtggtt ttcctttgaa aaacacgatg ataatatggc cacactagag atccaccggt 5640
cgccaccatg aaaaagcctg aactcaccgc gacgtctgtc gagaagtttc tgatcgaaaa 5700
gttcgacagc gtctccgacc tgatgcagct ctcggagggc gaagaatctc gtgctttcag 5760
cttcgatgta ggagggcgtg gatatgtcct gcgggtaaat agctgcgccg atggtttcta 5820
caaagatcgt tatgtttatc ggcactttgc atcggccgcg ctcccgattc cggaagtgct 5880
tgacattggg gaattcagcg agagcctgac ctattgcatc tcccgccgtg cacagggtgt 5940
cacgttgcaa gacctgcctg aaaccgaact gcccgctgtt ctgcagccgg tcgcggaggc 6000
catggatgcg atcgctgcgg ccgatcttag ccagacgagc gggttcggcc cattcggacc 6060
gcaaggaatc ggtcaatacg ctacatggcg tgatttcata tgcgcgattg ctgatccccg 6120
tgtgtatcac tggcaaactg tgatggacga caccgtcagt gcgtccgtcg cgcaggctct 6180
cgatgagctg atgctttggg ccgaggactg ccccgaagtc cggcacctcg tgcacgcggg 6240
tttcggctcc aacaatgtcc tgacggacaa tggccgcata acagcggtca ttgactggag 6300
cgaggcgatg ttcggggatt cccaatacga ggtcgccaac atcttcttct ggaggccgtg 6360
gttggcttgt atggagcagc agacgcgcta cttcgagcgg aggcatccgg agcttgcagg 6420
atcgccgcgg ctccgggcgt atatgctccg cattggtctt gaccaactct atcagagctt 6480
ggttgacggc aatttcgatg atgcagcttg ggcgcagggt cgatgcgacg caatcgtccg 6540
atccggagcc gggactgtcg ggcgtacaca aatcgcccgc agaagcgcgg ccgtctggac 6600
cgatggctgt gtagaagtac tcgccgatag tggaaaccga cgccccagca ctcgtccgag 6660
ggcaaaggaa taggcggccg cgtcgacaat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga 6720
ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg 6780
cctttgtatc atgctattgc ttcccgtatg gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc 6840
tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc 6900
actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt 6960
tccgggactt tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt 7020
gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg 7080
aagctgacgt cctttccatg gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg 7140
tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttccttccag cggcctgctg 7200
ccggctctgc ggcctcttcc gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt 7260
tgggccgcct ccccgcctgg aattcgagct cggtacctttaagaccaatg acttacaagg 7320
cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaaggggggactggaaggg ctaattcact 7380
cccaacgaag acaagatctg cttttgcttgtactgggtc tctctggtta gaccagatct 7440
gagcctggga gctctctggc taactagggaacccactgct taagcctcaa taaagcttgc 7500
cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc 7560
tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtag tagttcatgt catcttatta 7620
ttcagtattt ataacttgca aagaaatgaa tatcagagag tgagaggaac ttgtttattg 7680
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 7740
tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctggc 7800
tctagctatc ccgcccctaa ctccgcccat cccgccccta actccgccca gttccgccca 7860
ttctccgccc catggctgac taattttttttatttatgca gaggccgagg cgcctcggcc 7920
ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttttgga ggcctaggga cgtcccccat 7980
tcgccctata gtgagtcgta ttacgcgcgc tcactggccg tcgttttaca acgtcgtgac 8040
tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag cacatccccc tttcgccagc 8100
tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat 8160
ggcgaatggg acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc 8220
agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgctc ctttcgcttt cttcccttcc 8280
tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccctttaggg 8340
ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg tgatggttca 8400
cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga gtccacgttc 8460
tttaatagtg gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc ggtctattct 8520
tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa 8580
caaaaatttaacgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caatttaggt ggcacttttc 8640
ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc 8700
cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga 8760
gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc cttcctgttt 8820
ttgctcaccc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag 8880
tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag 8940
aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta 9000
ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg 9060
agtactcacc agtcacagaa aagcatcttacggatggcat gacagtaaga gaattatgca 9120
gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag 9180
gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatgggggg tcatgtaact cgccttgatc 9240
gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg 9300
tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc 9360
```

```
ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg 9420
ccottccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggtctcgcg 9480
gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga 9540
cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac 9600
tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa 9660
aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca 9720
aaatcccttа acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 9780
gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac 9840
cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 9900
ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc 9960
accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag 10020
tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac 10080
cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc 10140
gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc 10200
ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca 10260
cgagggagct tccagggggа aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc 10320
tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg 10380
ccagcaacgc ggcctttttа cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct 10440
ttcctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata 10500
ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc 10560
gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg 10620
acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca 10680
ctcattaggc accccaggct ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg 10740
tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagcgcgcaa 10800
ttaaccctca ctaaagggaa caaaagctgg agctgc                          10836
```

<210> 2

<211> 1662

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beşeri hiyalüronan sentaz 3 cDNA, transkript varyantı 1

<400> 2

```
atgccggtgc agctgacgac agccctgcgt gtggtgggca ccagcctgtt tgccctggca 60
gtgctgggtg gcatcctggc agcctatgtg acgggctacc agttcatcca cacggaaaag 120
cactacctgt ccttcggcct gtacggcgcc atcctgggcc tgcacctgct cattcagagc 180
ctgtttgcct tcctggagca ccggcgcatg cgacgtgccg gccaggccct gaagctgccc 240
tcccgcggc ggggctcggt ggcactgtgc attgccgcat accaggagga ccctgactac 300
ttgcgcaagt gcctgcgctc ggcccagcgc atctccttcc ctgacctcaa ggtggtcatg 360
gtggtggatg gcaaccgcca ggaggacgcc tacatgctgg acatcttcca cgaggtgctg 420
ggcggcaccg agcaggccgg cttctttgtg tggcgcagca acttccatga ggcaggcgag 480
ggtgagacgg aggccagcct gcaggagggc atggaccgtg tgcgggatgt ggtgcgggcc 540
agcaccttct cgtgcatcat gcagaagtgg ggaggcaagc gcgaggtcat gtacacggcc 600
ttcaaggccc tcggcgattc ggtggactac atccaggtgt gcgactctga cactgtgctg 660
gatccagcct gcaccatcga gatgcttcga gtcctggagg aggatccccа agtagggggа 720
gtcgggggag atgtccagat cctcaacaag tacgactcat ggatttcctt cctgagcagc 780
gtgcggtact ggatggcctt caacgtggag cgggcctgcc agtcctactt tggctgtgtg 840
cagtgtatta gtgggccctt gggcatgtac cgcaacagcc tcctccagca gttcctggag 900
gactggtacc atcagaagtt cctaggcagc aagtgcagct tcggggatga ccggcacctc 960
accaaccgag tcctgagcct tggctaccga actaagtata ccgcgcgctc caagtgcctc 1020
acagagaccc ccactaagta cctccggtgg ctcaaccagc aaaccccgctg gagcaagtct 1080
tacttccggg agtggctcta caactctctg tggttccata agcaccacct ctggatgacc 1140
tacgagtcag tggtcacggg tttcttcccc ttcttcctca ttgccacggt tatacagctt 1200
ttctaccggg gccgcatctg gaacattctc ctcttcctgc tgacggtgca gctggtgggc 1260
attatcaagg ccacctacgc ctgcttcctt cggggcaatg cagagatgat cttcatgtcc 1320
ctctactccc tcctctatat gtccagcctt ctgcoggcca agatctttgc cattgctacc 1380
atcaacaaat ctggctgggg cacctctggc cgaaaaacca ttgtggtgaa cttcattggc 1440
ctcattcctg tgtccatctg ggtggcagtt ctcctgggag ggctggccta cacagcttat 1500
```

```
tgccaggacc tgttcagtga gacagagcta gccttccttg tctctggggc tatactgtat 1560
ggctgctact gggtggccct cctcatgcta tatctggcca tcatcgcccg gcgatgtggg 1620
aagaagccgg agcagtacag cttggctttt gctgaggtgt ag                    1662
```

<210> 3

<211> 9197

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> pLV-EF1a-MCS-IRES-Hyg

<400> 3

aagcttaatg tagtcttatg caatactctt gtagtcttgc aacatggtaa cgatgagtta 60
gcaacatgcc ttacaaggag agaaaaagca ccgtgcatgc cgattggtgg aagtaaggtg 120
gtacgatcgt gccttattag gaaggcaaca gacgggtctg acatggattg gacgaaccac 180
tgaattgccg cattgcagag atattgtatt taagtgccta gctcgataca taaacgggtc 240
tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagggg acccactgct 300
taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg 420
cgcccgaaca gggacttgaa agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagcggc gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa 540
attttgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg 600
gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cggttaaggc caggggggaaa gaaaaaatat 660
aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc 720
ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
caaaggatag agataaaaga caccaaggaa gctttagaca agatagcggg agagcaaaac 900
aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
agtagcaccc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat 1140
gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat 1320
ttggggttgc tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag 1380
taataaatct ctggaacaga tttggaatca gacgacctgg atggagtggg acagagaaat 1440
taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
aacaaattgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
atcgtttcag acccacctcc caacccccgag gggacccgac aggcccgaag gaatagaaga 1740
agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctcgacggta 1800
tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tggggggtac agtgcagggg aaagaatagt 1860
agacataata gcaacagaca tacaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaattcaa 1920
aattttatcg atgcctcccc gtcaccaccc ccccaaccc gcccgaccg gagctgagag 1980
taattcatac aaaaggactc gcccctgcct tggggaatcc cagggaccgt cgttaaactc 2040
ccactaacgt agaacccaga gatcgctgcg ttcccgcccc ctcacccgcc cgctctcgtc 2100
atcactgagg tggagaagag catgcgtgag gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca 2160
catcgcccac agtccccgag aagttggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga 2220
gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagtg atgtcgtgta ctggctccgc cttttcccg 2280
agggtggggg agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg 2340
ggtttgccgc cagaacacag gtaagtgccg tgtgtggttc ccgcgggcct ggcctcttta 2400
cgggttatgg ccttgcgtg ccttgaatta cttccacgcc cctggctgca gtacgtgatt 2460
cttgatcccg agcttcgggt tggaagtggg tgggagagtt cgaggccttg cgcttaagga 2520
gccccttcgc ctcgtgcttg agttgaggcc tggcctgggc gctggggccg ccgcgtgcga 2580
atctggtggc accttcgcgc ctgtctcgct gctttcgata agtctctagc catttaaaat 2640
ttttgatgat atcctgcgac gcttttttc tggcaagata gtcttgtaaa tgcgggccaa 2700
gatctgcaca ctggtatttc ggttttgggg gccgcgggcg gcgacggggc ccgtgcgtcc 2760
cagcgcacat gttcggcgag gcggggcctg cgagcgcggc caccgagaat cggacggggg 2820
tagtctcaag ctggccggcc tgctctggtg cctggcctcg cgccgccgtg tatcgccccg 2880
ccctgggcgg caaggctggc ccggtcggca ccagttgcgt gagcggaaag atggccgctt 2940
cccggccctg ctgcagggag ctcaaaatgg aggacgcggc gctcgggaga gcgggcgggt 3000

gagtcacoca cacaaaggaa aagggccttt ccgtcctcag ccgtcgcttc atgtgactcc 3060
acggagtacc gggcgccgtc caggcacctc gattagttct ogagcttttg gagtacgtcg 3120
tctttaggtt gggggggaggg gttttatgcg atggagttic cccacactga gtgggtggag 3180
actgaagtta ggccagcttg gcacttgatg taattctcct tggaatttgc cctttttgag 3240
tttggatctt ggttcattct caagcctcag acagtggttc aaagtttttt tcttccattt 3300
caggtgtcgt gaaaactacc cctctagata atacgactca ctataggggc cgggttggat 3360
ccacgcgtct ccggcctagg gataacaggg taatcogcta gccccctctcc ctcccccccc 3420
cctaacgtta ctggccgaag ccgcttggaa taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta 3480
ttttccacca tattgccgtc ttttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg ccctgtcttc 3540
ttgacgagca ttcctagggg tctttcccct ctcgccaaag gaatgcaagg tctgttgaat 3600
gtcgtgaagg aagcagttac tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc 3660
ctttgcaggc agcggaaccc cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt 3720
gtataagata cacctgcaaa ggcggcacaa ccccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt 3780
gtggaagagg tcaaatggct ctcctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgcccag 3840
aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggt acacatgctt tacatgtgtt 3900
tagtcgaggt taaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtggt tttcctttga 3960
aaaacacgat gataatatgg ccacactaga gatccaccgg tcgccaccat gaaaaagcct 4020
gaactcaccg cgacgtctgt cgagaagttt ctgatcgaaa agttcgacag cgtctccgac 4080
ctgatgcagc tctcggaggg cgaagaatct cgtgctttca gcttcgatgt aggagggcgt 4140
ggatatgtcc tgcgggtaaa tagctgcgcc gatggtttct acaaagatcg ttatgtttat 4200
cggcactttg catcggccgc gctcccgatt ccggaagtgc ttgacattgg ggaattcagc 4260
gagagcctga cctattgcat ctcccgccgt gcacagggtg tcacgttgca agacctgcct 4320
gaaaccgaac tgcccgctgt tctgcagccg gtcgcggagg ccatggatgc gatcgctgcg 4380
gccgatctta gccagacgag cgggttcggc ccattcggac cgcaaggaat cggtcaatac 4440
actacatggc gtgatttcat atgcgcgatt gctgatcccc atgtgtatca ctggcaaact 4500
gtgatggacg acaccgtcag tgcgtccgtc gcgcaggctc tcgatgagct gatgctttgg 4560
gccgaggact gccccgaagt ccggcacctc gtgcacgcgg atttcggctc caacaatgtc 4620
ctgacggaca atggccgcat aacagcggtc attgactgga gcgaggcgat gttcggggat 4680
tcccaatacg aggtcgccaa catcttcttc tggaggccgt ggttggcttg tatggagcag 4740
cagacgcgct acttcgagcg gaggcatccg gagcttgcag gatcgccgcg gctccgggcg 4800
tatatgctcc gcattggtct tgaccaactc tatcagagct tggttgacgg caatttcgat 4860
gatgcagctt gggcgcaggg tcgatgcgac gcaategtcc gatccggagc cgggactgtc 4920
gggcgtacac aaatcgcccg cagaagcgcg gccgtctgga ccgatggctg tgtagaagta 4980
ctcgccgata gtggaaaccg acgccccagc actcgtccga gggcaaagga ataggcggcc 5040
gcgtcgacaa tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt attcttaact 5100
atgttgctcc ttttacgcta tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg 5160
cttccogtat ggctttcatt ttctcctcct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg 5220
aggagttgtg gcccgttgtc aggcaacgtg gcgtggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa 5280
cccccactgg ttggggcatt gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc 5340
ccctcgctat tgccacggcg gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgctgc tggacagggg 5400
ctcggctgtt gggcactgac aattccgtgg tgttgtcggg gaagctgacg tcctttccat 5460
ggctgctcgc ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt 5520
cggccctcaa tccagcggac cttccttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc 5580
cgcgtcttcg ccttcgccct cagacgagtc ggatctccct ttgggccgcc tccccgcctg 5640
gaattcgagc tcggtacctt taagaccaat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca 5700
cttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac tcccaacgaa gacaagatct 5760
gcttttgct tgtactgggt ctctctggtt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg 5820
ctaactaggg aacccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt 5880
gtgtgcccgt ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctcagaccct tttagtcagt 5940
gtggaaaatc tctagcagta gtagttcatg tcatcttatt attcagtatt tataacttgc 6000
aaagaaatga atatcagaga gtgagaggaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa 6060
ataaagcaat agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc attctagttg 6120
tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg ctctagctat cccgcccota 6180
actccgcccc tcccgccccc aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 6240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 6300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggg acgtacccaa ttcgccctat agtgagtcgt 6360
attacgcgcg ctcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgtta 6420
cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg 6480
cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct 6540
gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg 6600
ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg 6660
gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgctttac 6720
ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct 6780

```
gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt 6840
tccaaactgg aacaacactc aacccctatct cggtctattc ttttgattta taagggattt 6900
tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt 6960
ttaacaaaat attaacgctt acaatttagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac 7020
ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc 7080
ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt 7140
cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct 7200
ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga 7260
tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag 7320
cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca 7380
actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga 7440
aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag 7500
tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc 7560
ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa 7620
tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt 7680
gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg 7740
gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt 7800
tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg 7860
gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat 7920
ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact 7980
gtcagaccaa gtttactcat atatactttа gattgatttа aaacttcatt tttaatttaa 8040
aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt 8100
ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt 8160
ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg 8220
tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca 8280
gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt 8340
agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga 8400
taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc 8460
gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact 8520
gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaagggа gaaaggcgga 8580
caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccagggгg 8640
aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt 8700
tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt 8760
acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga 8820
ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac 8880
gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc 8940
tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa 9000
agcgggcagt gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccccaggc 9060
tttacacttt atgcttccgg ctcgtatgtt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca 9120
cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagcgcgca attaaccctc actaaaggga 9180
acaaaagctg gagctgc                                              9197
```

<210> 4

<211> 6630

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> HZ24 vektörü

<400> 4

```
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac 540
caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
```

caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc 660
cgcccagttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720
tcgtttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaat 780
tgctaacgca gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc 840
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900
actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960
tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcatg ggagtgctaa aattcaagca 1080
catcttttc agaagctttg ttaaatcaag tggagtatcc cagatagttt tcaccttcct 1140
tctgattcca tgttgcttga ctctgaattt cagagcacct cctgttattc caaatgtgcc 1200
tttcctctgg gcctggaatg ccccaagtga attttgtctt ggaaaatttg atgagccact 1260
agatatgagc ctcttctctt tcataggaag ccccagaata aacgccaccg ggcaaggtgt 1320
tacaatattt tatgttgata gacttggcta ctatccttac atagattcaa tcacaggagt 1380
aactgtgaat ggaggaatcc cccagaagat ttccttacaa gaccatctgg acaaagctaa 1440
gaaagacatt acattttata tgccagtaga caatttggga atggctgtta ttgactggga 1500
agaatggaga cccacttggg ccagaaactg gaaacctaaa gatgtttaca agaataggtc 1560
tattgaattg gttcagcaac aaaatgtaca acttagtctc acagaggcca ctgagaaagc 1620
aaaacaagaa tttgaaaagg cagggaagga tttcctggta gagactataa aattgggaaa 1680
attacttcgg ccaaatcact tgtggggtta ttatcttttt ccggattgtt acaaccatca 1740
ctataagaaa cccggttaca atggaagttg cttcaatgta gaaataaaaa gaaatgatga 1800
tctcagctgg ttgtggaatg aaagcactgc tctttaccca tccatttatt tgaacactca 1860
gcagtctcct gtagctgcta cactctatgt gcgcaatcga gttcgggaag ccatcagagt 1920
ttccaaaata cctgatgcaa aaagtccact tccggttttt gcatataccc gcatagtttt 1980
tactgatcaa gttttgaaat tccttttctca agatgaactt gtgtatacat ttggcgaaac 2040
tgttgctctg ggtgcttctg gaattgtaat atggggaacc ctcagtataa tgcgaagtat 2100
gaaatcttgc ttgctcctag acaattacat ggagactata ctgaatcctt acataatcaa 2160
cgtcacacta gcagccaaaa tgtgtagcca agtgctttgc caggagcaag gagtgtgtat 2220
aaggaaaaac tggaattcaa gtgactatct tcacctcaac ccagataatt ttgctattca 2280
acttgagaaa ggtggaaagt tcacagtacg tggaaaacag acacttgaag acctggagca 2340
attttctgaa aaattttatt gcagctgtta tagcaccttg agttgtaagg agaaagctga 2400
tgtaaaagac actgatgctg ttgatgtgtg tattgctgat ggtgtctgta tagatgcttt 2460
tctaaaacct cccatggaga cagaagaacc tcaaatttte tactgaggat ccatagctaa 2520
cgcccctctc cctccccccc ccctaacgtt actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg 2580
tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgaggggc 2640
cggaaacctg gcccctgtct cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa 2700
ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga 2760
caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaacc ccccacctgg cgacaggtgc 2820
ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc 2880
cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac 2940
aaggggctga aggatgcccc gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg 3000
tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac 3060
ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga tgataagctt gccacaaccc acagcggccg 3120
ctgccatcat ggttcgacca ttgaactgca tcgtcgccgt gtcccaaaat atggggattg 3180
gcaagaacgg agacctaccc tggcctccgc tcaggaacga gttcaagtac ttccaaagaa 3240
tgaccacaac ctcttcagtg gaaggtaaac agaatctggt gattatgggt aggaaaacct 3300
ggttctccat tcctgagaag aatcgacctt taaaggacag aattaatata gttctcagta 3360
gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc caaaagtttg gatgatgcct 3420
taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaagtaga catggtttgg atagtcggag 3480
gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca cctcagactc tttgtgacaa 3540
ggatcatgca ggaatttgaa agtgcacgct ttttcccaga aattgatttg gggcaatata 3600
aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca ggaggaaaaa ggcatcaagt 3660
ataagtttga agtctacgag aagaaagact aaacgcgtgg taacctctaga gtcgacccgg 3720
gcggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 3780
aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 3840
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 3900
tcagggggag atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat 3960
cgataaggat cgggctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca 4020
gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt 4080
gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 4140
gctttcttcc cttcctttct cgccacgttc gccggctttc ccccgtcaagc tctaaatcgg 4200
gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4260
tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg 4320
ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 4380

```
atctcggtct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 4440
aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
tcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 4560
ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4620
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 4680
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc 4740
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt 4800
agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt ccctttttg 4980
cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 5160
gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 5220
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact 5340
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 5400
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 5460
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg 5520
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 5580
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 5640
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5700
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5760
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
atatactttа gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5940
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 6000
gcttgcaaac aaaaaaccca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 6060
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgctaat cctgttaccа gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 6240
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 6300
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaag cgccacgctt cccgaagggа gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 6600
ggccttttgc tcacatggct cgacagatct                                  6630
```

<210> 5

<211> 1446

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> çözünür beşeri PH20 öncüsünü kodlayan DNA

<400> 5

```
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt cctttgtgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttcoggatt gttacaaoca tcactataag aaaccoggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
```

```
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttt gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac                                                          1446
```

<210> 6

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> öncü tam uzunlukta beşeri PH20 proteini 1-509

<220>

<221> SİNYAL

<222> (1)...(35)

<223> sinyal dizisi

<400> 6

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

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

<210> 7

<211> 482

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> öncü özünür beşeri PH20, amino asit kalıntıları 1-482

<220>

<221> SİNYAL

<222> (1)...(35)

<223> sinyal dizisi

<400> 7

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

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

<210> 8

<211> 186

<212> PRT

<213> Mus musculus (Ev faresi)

<220>

<223> fare dihidrofolat redüktaz proteini

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 1449

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 3D35M hücrelerinden pH20 mRNA dizisi (baz 1131'de c ila a'yı içerir)

<400> 9

```
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccaga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag tcaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactga                                                        1449
```

<210> 10

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CTLA4

<300>

<308> GenBank: AAL07473.1

<309> 2001-09-26

<400> 10

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

<210> 11

<211> 123

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CTLA-4 bağlayıcı aptamer M9a-1

<400> 11

```
ggggaattc taatacgact cactataggg agaggaaag agggataggc cgcccgagta 60
caaacgtact cgcctgtttg cccaaccgac ataacccaga ggtcgatagt acyggatccc 120
ccc                                                               123
```

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> CTLA-4 bağlayıcı aptamer M9a-4

<400> 12

cagccaaagg atatccaagc ggcacgccat aacacaacac 40

<210> 13

<211> 41

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CTLA-4 bağlayıcı aptamer M9a-5

<400> 13

caccggaagg gctacactcc tatatcccct gcccagcccg c 41

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CTLA-4 bağlayıcı aptamer M9a-8

<400> 14

accacagcct ttatccaagc gggtgagccc cgtgaacaat 40

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CTLA-4 bağlayıcı aptamer M9a-9

<400> 15

ccgacgtgcc gcaacttcaa ccctgcacaa ccaatccgcc 40

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CTLA-4 bağlayıcı aptamer M9a-14

<400> 16

caacgaaagg tgctccacta agaatggaac ttctgcgatc 40

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CTLA-4 bağlayıcı aptamer M9a-15

<400> 17

gtgctcaatc acgaacccgc tcgacttctt ctcccaagcc 40

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CTLA-4 bağlayıcı aptamer M9a-18

<400> 18

tgctccaaca ctcacttcgg aaccacctgc attccgctct 40

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> c-myc

<400> 19

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> FLAG etiketi

<400> 20

```
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1               5
```

<210> 21

<211> 355

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İpilimumab ağır zincir değişken sahası (VH)

<400> 21

```
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatacta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcattt atatcatatg atggaaacaa taaatactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctatat attactgtgc gaggaccggc 300
tggctggggc cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag      355
```

<210> 22

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İpilimumab ağır zincir değişken sahası (VH)

<400> 22

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


Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 23

<211> 325

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İpilimumab hafif zincir değişken sahası (VH)

<400> 23

```
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttggc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaac                                       325
```

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İpilimumab hafif zincir değişken sahası (VH)

<400> 24

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

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İpilimumab VH CDR1

<400> 25

```
Ser Tyr Thr Met His
 1               5
```

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İpilimumab VH CDR2

<400> 26

```
Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1               5                  10                  15
Gly
```

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İpilimumab VH CDR3

<400> 27
Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İpilimumab VL CDR1

<400> 28
Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İpilimumab VL CDR2

<400> 29
Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İpilimumab VL CDR3

<400> 30
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> His Etiketi

<400> 31

```
His His His His His His
 1               5
```

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> HA Etiketi

<400> 32

```
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1               5
```

<210> 33

<211> 500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tremelimumab ağır zincir değişken sahası (VH)

<400> 33

```
ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccttc 60
agtagctatg gcatgcactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 120
gttatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc 180
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag 240
gacacggctg tgtattactg tgcgagagat ccgagggggag ctaccctta ctactactac 300
tacgggatgg acgtctgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 360
ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 480
gctctgacca gcggcgtgca                                           500
```

<210> 34

<211> 167

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tremelimumab ağır zincir değişken sahası (VH)

<400> 34

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu
                85                  90                  95
Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
            100                 105                 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165
```

<210> 35

<211> 417

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tremelimumab hafif zincir değişken sahası (VH)

<400> 35

```
ccatcctccc tgtctgcatc tgtaggagac agagtcacca tcacttgccg ggcaagtcag 60
agcattaaca gctatttaga ttggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc taaactcctg 120
atctatgctg catccagttt gcaaagtggg gtcccatcaa ggttcagtgg cagtggatct 180
gggacagatt tcactctcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac 240
tgtcaacagt attacagtac tccattcact ttcggccctg ggaccaaagt ggaaatcaaa 300
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 360
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagta    417
```

<210> 36

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tremelimumab hafif zincir değişken sahası (VH)

<400> 36

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

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> (-G4S-)1 Bağlayıcı

<400> 37

```
Gly Gly Gly Gly Ser
 1               5
```

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> (-G4S-)2 Bağlayıcı

<400> 38

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1               5                  10
```

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> (Gly4Ser)3 Bağlayıcı

<400> 39

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1               5                  10                  15
```

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> (-G4S-)4 Bağlayıcı

<400> 40

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1               5                  10                  15
Gly Gly Gly Ser
            20
```

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> (-G4S-)5 Bağlayıcı

<400> 41

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1               5                  10                  15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser


20                  25
```

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> VSV-G

<400> 42

```
Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 1               5                  10
```

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> HSV

<400> 43

```
Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
 1               5                  10
```

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> V5

<400> 44

```
Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 1               5                  10
```

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Poly Arg Yapay Dizi

<220>

<223> Poly Arg Tag

<400> 45

```
Arg Arg Arg Arg Arg
 1               5
```

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Strep-tag-II

<400> 46

```
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1               5
```

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> S Epitop Etiketi

<400> 47

```
Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
 1               5                  10                  15
```

<210> 48

<211> 22

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 3x FLAG Etiketi

<400> 48

```
Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 1               5                  10                  15
Lys Asp Asp Asp Asp Lys
            20
```

<210> 49

<211> 19

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> HAT Etiketi

<400> 49

```
Lys Asp His Leu Ile His Asn Val His Lys Glu Phe His Ala His Ala
 1               5                  10                  15
His Asn Lys
```

<210> 50

<211> 38

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> SBP Etiketi

<400> 50

```
Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
 1               5                  10                  15
Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
            20                  25                  30
Gln Gly Gln Arg Glu Pro
        35
```

<210> 51

<211> 2116

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HAS1

<400> 51

cggagagaag agagagcccg gccagaccca ctgcgatgag acagcaggac gcgcccaagc 60
ccactcctgc agcctgccgc tgctccggcc tggcccggag ggtgctgacc atcgccttcg 120
ccctgctcat cctgggcctc atgacctggg cctacgccgc cggggtgccg ctggcctccg 180
atcgctacgg catccatggc ttcggcctct acggggcctt catttcagcg cacctggtgg 240
cgcagagcct cttcgcgtac ctggagcacc ggcgggtggc ggcggcggcg cgggggccgc 300
tggatgcagc cacccgcgcc agtgtggcgc tgaccatctc cgcctaccag gaggaccccg 360
cgtacctgcg ccagtgcctg gcgtccgccc gcgccctgct gtaccccgcc gccgcggctgc 420
gcgtcctcat ggtggtggat ggcaaccgcg ccgaggacct ctacatggtc gacatgttcc 480
gcgaggtctt cgctgacgag gacccccgcca cgtacgtgtg ggacggcaac taccaccagc 540
cctgggaacc cgcggccgcg ggcgcggtgg gcgccggagc ctatcgggag gtggaggcgg 600
aggatcctgg gcggctggca gtggaggcgc tggtgaggac tcgcaggtgc gtgtgcgtgg 660
cgcagcgctg gggcggcaag cgcgaggtca tgtacacagc cttcaaggcg ctcggagatt 720
cggtggacta cgtgcaggtc tgtgactcgg acacaaggtt ggaccccatg gcactgctgg 780
agctcgtgcg ggtactggac gaggaccccc gggtaggggc tgttggtggg gacgtgcgga 840
tcattaacac tatggactac tgggtcagct tcctaagcag cctgcgatac tgggtagcct 900
tcaatgtgga gcgggcttgt cagagctact tccactgtgt atcctgcatc agcggtcctc 960
taggcctata taggaataac ctcttgcagc agtttcttga ggcctggtac aaccagaagt 1020
tcctgggtac ccactgtact tttggggatg accggcacct caccaacccc atgctcagca 1080
tgggttatgc taccaagtac acctccaggt cccgctgcta ctcagagacg cgctcgtcct 1140
tcctgcggtg gctgagccag cagacacgct ggtccaagtc gtacttccgt gagtggctgt 1200
acaacgcgct ctggtggcac cggcaccatg cgtggatgac ctacgaggcg gtggtctccg 1260
gcctgttccc cttcttcgtg gcggccactg tgctgcgtct gttctacgcg ggccgccctt 1320
gggcgctgct gtgggtgctg ctgtgcgtgc agggcgtggc actggccaag gcggccttcg 1380
cggcatggct gcggggctgc atgcgcatgg tgcttctgtc gctctacgcg cccctctaca 1440
tgtgtggcct cctgcctgcc aagttcctgg cgctagtcac catgaaccag agtggctggg 1500
gcacctcggg ccggcggaag ctggccgcta actacgtccc tctgctgccc ctggcgctct 1560
gggcgctgct gctgcttggg ggcctggtcc gcagcgtagc acacgaggcc agggccgact 1620
ggagcggccc ttcccgcgca gccgaggcct accacttggc cgcgggggcc ggcgcctacg 1680
tgggctactg ggtggccatg ttgacgctgt actgggtggg cgtgcggagg ctttgccggc 1740
ggcggaccgg gggctaccgc gtccaggtgt gagtccagcc acgcggatgc cgcctcaagg 1800
gtcttcaggg gaggccagag gagagctgct gggccccgag ccacgaactt gctgggtggt 1860
tctctgggcc tcagtttccc tcctctgcaa aacgagggcg tcagccccaag attcttcagt 1920
ctggactata ttgggactgg gacttctggg tctccaggga gggtatttat tggtcagggt 1980
gtgggatctg aggagtggag ggaaagggtc ctgctttctc ctcgttctta tttaatctcc 2040
atttctactg tgtgatcagg atgtaataaa gaatttttatt tattttcaaa aaaaaaaaaa 2100
aaaaaaaaaa aaaaaa 2116

<210> 52

<211> 3275

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HAS2

<400> 52

gaagtcaaga cgtctggaaa gaattaccca gtcctggctt cgagcagccc attgaaccag 60
agacttgaaa cagccccagc caaagacttt tctcccaatt ctgcgcttcc tgggttctgc 120
tgagtcttcc acaggctttt ttttttttt ttttttttt taagacgaaa aagagatttt 180
ctgttatcgg gggcagaaag actgaagccc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagaaaagaa 240
aagaaaaaag aaaagttaat ttatttttaa agcataattt ttttaagaat tagactgaag 300
tgcaacggaa acataaagag aatattagtg aaattatttt ttaaagtggg gaagaatcaa 360

```
acatttaaga ctcccctatc ctttttaaat gttgttttta aatttcttat ttttttggc 420
cggtcgtctc aaattcatct gatctcttat tacctcaatt ttggaaactg cccgccacog 480
accctccggg accacacaga caggctgagg acgactttat gaccaagagc tgaacaagat 540
gcattgtgag aggtttctat gtatcctgag aataattgga accacactct ttggagtctc 600
tctcctcctt ggaatcacag ctgcttatat tgttggctac cagtttatcc aaacggataa 660
ttactatttc tcttttggac tgtatggtgc ctttttggca tcacacctca tcatccaaag 720
cctgtttgcc tttttggagc accgaaaaat gaaaaaatcc ctagaaaccc ccataaagtt 780
gaacaaaaca gttgcccttt gcatcgctgc ctatcaagaa gatccagact acttaaggaa 840
atgtttgcaa tctgtgaaaa ggctaacctа ccctgggatt aaagttgtca tggtcatagа 900
tgggaactca gaagatgacc tttacatgat ggacatcttc agtgaagtca tgggcagaga 960
caaatcagcc acttatatct ggaagaacaa cttccacgaa aagggtcccg gtgagacaga 1020
tgagtcacat aaagaaagct cgcaacacgt aacgcaattg gtcttgtcca acaaaagtat 1080
ctgcatcatg caaaaatggg gtggaaaaag agaagtcatg tacacagcct tcagagcact 1140
gggacgaagt gtggattatg tacaggtttg tgattcagac actatgcttg acccagcctc 1200
atctgtggag atggtaaaag ttttagaaga agatcccatg gttgggggtg ttgggggaga 1260
tgtccagatt ttaaacaagt acgattcctg gatctcattc ctcagcagtg taagatattg 1320
gatggctttt aatatagaaa gggcctgtca gtcttatttt gggtgtgttc agtgcattag 1380
tggacctctg ggaatgtaca gaaactcctt gttgcatgag tttgtggaag attggtacaa 1440
tcaagaattt atgggcaacc aatgtagctt tggtgatgac aggcatctca cgaaccgggt 1500
gctgagcctg ggctatgcaa caaaatacac agctcgatct aagtgcctta ctgaaacacc 1560
tatagaatat ctcagatggc taaaccagca gaccogttgg agcaagtcct acttccgaga 1620
atggctgtac aatgcaatgt ggtttcacaa acatcacttg tggatgacct acgaagcgat 1680
tatcactgga ttctttcctt tctttctcat tgccacagta atccagctct tctaccgggg 1740
taaaatttgg aacattctcc tcttcttgtt aactgtccag ctagtaggtc tcataaaatc 1800
atcttttgcc agctgcctta gaggaaatat cgtcatggtc ttcatgtctc tctactcagt 1860
gttatacatg tcgagtttac ttcccgccaa gatgtttgca attgcaacaa taaacaaagc 1920
tgggtggggc acatcaggaa ggaaaaccat tgttgttaat ttcataggac tcattccagt 1980
atcagtttgg tttacaatcc tcctgggtgg tgtgattttc accatttata aggagtctaa 2040
aaggccattt tcagaatcca aacagacagt tctaattgtt ggaacgttgc tctatgcatg 2100
ctattgggtc atgcttttga cgctgtatgt agttctcatc aataagtgtg gcaggcggaa 2160
gaagggacaa caatatgaca tggtgcttga tgtatgatct tccatgtttt gacgtttgca 2220
gtcacacaca acaccttagt tcctctaggg gctgtacagt attgtggcat cagataatgc 2280
cacaaaagga gacatatcac tgctgctggg acttgaacaa agacatttat atgggtttat 2340
tttcattctg ccaaagtaaa acaatacatc aacaagaaga aactcagatt taacctgtta 2400
tttctatgaa aatgggatga attctttgtt tatgcacttt ttccttactg tgcatccgcc 2460
tgaaagtgtt ttgccctata tacctcacta gccatgcttt atgtgggtta tcatggaaga 2520
aaaggatttt ggaaactcaa ggaaaagttc tttcaaccta tacaacctaa cttatggact 2580
gttttgatag atgataattt ttttttttta ggaaggattt tctttttaac tttaccaaat 2640
gaaatgccaa aggaagtttt aaaggccgtt ggctgtgctg tattttgata taattgtact 2700
gtgtttttaa attttgtatg ccaatcttaa agacaaattt tgcatattct ctatttтact 2760
tttctgccaa aataaacctg ttcttcctтt tttaaaataa aataagttct taaaaaattt 2820
atacttaaaa aatcctgcac aaaatgtgaa gcttggttga ctgatgttca tgatagaaag 2880
aataaaatgt ttctctctct ctaccttttа aaattgaata gtttatttct gtgaaagaag 2940
tatttaaact ttcaatattt taacttttтg tttttatttc ttttagaaaa ggccaatata 3000
cctatcacac tttggaagta aaaatacaca ctttcgtgtg tacctaaaaa aaaaatcgtt 3060
gaaaatcaag gccaaaggta gtgcaatttt ttcattaaga tttaaaaaaa agggaatgat 3120
agtctttgaa agaaaacagt aggcatccag cactggacaa aacatgggta tcaaagatga 3180
ataatctttg gagattctgg cagtgttttc ccagaacaag tcaagtggaa agtggagaaa 3240
ttatctgtat aattttggac acatacaatg cagtt                          3275
```

<210> 53

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Nivolumab ağır zincir değişken bölgesi

<400> 53

```
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
gactgtaaag cgtctggaat caccttcagt aactctggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atttggtatg atggaagtaa aagatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gacaaacgac 300
gactactggg gccagggaac cctggtcacc gtctcctca                          339
```

<210> 54

<211> 113

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Nivolumab ağır zincir değişken bölgesi

<400> 54

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

<210> 55

<211> 321

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Nivolumab hafif zincir değişken bölgesi

<400> 55

```
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agttacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag agtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a                                            321
```

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Nivolumab hafif zincir değişken bölgesi

<400> 56

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Nivolumab VH CDR1

<400> 57

```
Asn Ser Gly Met His
 1               5
```

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Nivolumab VH CDR2

<400> 58

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 59

<211> 4

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Nivolumab VH CDR3

<400> 59

Asn Asp Asp Tyr
1

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Nivolumab VL CDR1

<400> 60

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Nivolumab VL CDR2

<400> 61

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Nivolumab VL CDR3

<400> 62

```
Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
 1               5
```

<210> 63

<211> 1340

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 tam uzunlukta ağır zincir

<400> 63

```
aggtgcagct ggtgcagtcc ggcgtggagg tgaagaagcc tggcgcctcc gtcaaggtgt 60
cctgtaaggc ctccggctac accttcacca actactacat gtactgggtg cggcaggccc 120
caggccaggg actggagtgg atgggcggca tcaaccctte caacggcggc accaacttca 180
acgagaagtt caagaaccgg gtgaccctga ccaccgactc ctccaccaca accgcctaca 240
tggaactgaa gtccctgcag ttcgacgaca ccgccgtgta ctactgcgcc aggcgggact 300
accggttcga catgggcttc gactactggg gccagggcac cacogtgacc gtgtcctccg 360
ctagcaccaa gggcccttcc gtgttccctc tggccccttg ctccoggtcc acctccgagt 420
ccaccgccgc tctgggctgt ctggtgaagg actacttccc tgagcctgtg accgtgagct 480
ggaactctgg cgccctgacc tccggcgtgc acaccttccc tgccgtgctg cagtcctccg 540
gcctgtactc cctgtcctcc gtggtgaccg tgccttcctc ctcccttggc accaagacct 600
acacctgcaa cgtggaccac aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagtcca 660
agtacggccc tccttgccct ccctgccctg ccoctgagtt cctgggcgga ccctccgtgt 720
tcctgttccc tcctaagcct aaggacaccc tgatgatctc ccggacccct gaggtgacct 780
gcgtggtggt ggacgtgtcc caggaagatc ctgaggtcca gttcaattgg tacgtggatg 840
gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ctcgggagga acagttcaac tccacctacc 900
gggtggtgtc tgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag gaatacaagt 960
gcaaggtcag caacaagggc ctgccctcct ccatcgagaa aaccatctcc aaggccaagg 1020
gccagcctcg cgagcctcag gtgtacaccc tgcctcctag ccaggaagag atgaccaaga 1080
atcaggtgtc cctgacatgc ctggtgaagg gcttctaccc ttccgatatc gccgtggagt 1140
gggagagcaa cggccagccg gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg ctggactccg 1200
acggctcctt cttcctgtac tccaggctga ccgtggacaa gtcccggtgg caggaaggca 1260
acgtctttte ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagtccc 1320
tgtccctgtc tctgggcaag                                          1340
```

<210> 64

<211> 447

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 tam uzunlukta ağır zincir

<400> 64

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

<210> 65

<211> 334

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 tam uzunlukta hafif zincir

<400> 65

```
cgagatcgtg ctgacccagt cccctgccac cctgtcoctg agocctggcg agogggctac 60
cctgagctgc agagcctcca agggcgtgtc cacctcoggc tactcctacc tgcactggta 120
tcagcagaag ccaggccagg cccctcggct gctgatctac ctggcctcct acctggagtc 180
cggcgtgcct gcccggttct ccggctccgg aagcggcacc gacttcaccc tgaccatctc 240
ctccctggag cctgaggact tcgccgtgta ctactgccag cactccoggg acctgcctct 300
gacctttggc ggcggaacaa aggtggagat caag                            334
```

<210> 66

<211> 218

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 tam uzunlukta hafif zincir

<400> 66

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

<210> 67

<211> 361

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 ağır zincir değişken sahası

<400> 67

```
ccaggtgcag ctggtgcagt ccggcgtgga ggtgaagaag cctggcgcct ccgtcaaggt 60
gtcctgcaag gcctccggct acaccttcac caactactac atgtactggg tgcggcaggc 120
tcccggccag ggactggagt ggatgggcgg catcaaccct tccaacggcg gcaccaactt 180
caacgagaag ttcaagaacc gggtgaccct gaccaccgac tcctccacca ccaccgccta 240
catggagctg aagtccctgc agttcgacga caccgccgtg tactactgcg ccaggcggga 300
ctaccggttc gacatgggct tcgactactg gggccagggc accaccgtga ccgtgtcctc 360
c                                                                  361
```

<210> 68

<211> 120

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 ağır zincir değişken sahası

<400> 68

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

<210> 69

<211> 333

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 hafif zincir değişken sahası

<400> 69

```
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcactggtat 120
caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctatc ttgcatccta cctagaatct 180
ggcgtcccag ccaggttcag tggtagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc 240
agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc acagcaggga ccttccgctc 300
acgttcggcg gagggaccaa agtggagatc aaa                               333
```

<210> 70

<211> 111

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 hafif zincir değişken sahası

<400> 70

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1               5                  10                  15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

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

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 VH CDR1

<400> 71

```
Asn Tyr Tyr Met Tyr
 1               5
```

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 VH CDR2

<400> 72

```
Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
 1               5                  10                  15
Asn
```

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 VH CDR3

<400> 73

```
Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
 1               5                  10
```

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 VL CDR1

<400> 74

```
Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
 1               5                  10                  15
```

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> MK-3475 VL CDR2Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 VL CDR2

<400> 75

```
Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 1               5
```

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MK-3475 VL CDR3

<400> 76

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 77

<211> 1401

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Pidilizumab tam uzunlukta ağır zincir

<400> 77

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccactcccag 60
gtgcagctgg tgcaatctgg gtctgagctt aagaagcctg gggcctcagt gaagatctcc 120
tgcaaggctt ctggatatac tttcacaaac tatggaatga actgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttcagtggat gggatggata aacaccgaca gtggagagtc aacatatgct 240
gaagagttca agggacggtt tgtcttctcc ttggacacct ctgtcaacac ggcatatctg 300
cagatcacca gcctcacggc tgaggacact ggcatgtatt tctgtgtgag agtcggctac 360
gatgctttgg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcgagcgc ctccaccaag 420
ggcccatcgg tcttcccgct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 540
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 720
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggac gtcagtcttc 780
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg 960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcccg acgacatcgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tccctgtctc cgggtaaatg a 1401

<210> 78

<211> 466

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Pidilizumab tam uzunlukta ağır zincir

<400> 78

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


            420                 425                 430
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460
Gly Lys
465
```

<210> 79

<211> 708

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Pidilizumab tam uzunlukta hafif zincir

<400> 79

```
atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct ccccaggtgcc 60
aaatgtgaaa ttgttgttgac gcagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgcagtgc caggtcaagt gtaagttaca tgcactggtt ccagcagaaa 180
ccagggaaag cccctaagct ctggatctat aggacatcca acctggcttc tggggtcccca 240
tctagattca gcggcagtgg atctgggaca tcttactgtc tcaccatcaa cagcctgcag 300
cctgaagatt ttgcaactta ctattgccag caaaggagta gtttccccact cacgttcggc 360
ggagggacca agctggagat caaacgtact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag              708
```

<210> 80

<211> 235

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Pidilizumab tam uzunlukta hafif zincir

<400> 80

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

```
            180                 185                 190
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
        195                 200                 205
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
    210                 215                 220
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 81

<211> 421

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> Pidilizumab ağır zincir değişken sahası

<400> 81

```
atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccactcccag 60
gtgcagctgg tgcaatctgg gtctgagctt aagaagcctg gggcctcagt gaagatctcc 120
tgcaaggctt ctggatatac tttcacaaac tatggaatga actgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttcagtggat gggatggata aacaccgaca gtggagagtc aacatatgct 240
gaagagttca agggacggtt tgtcttctcc ttggacacct ctgtcaacac ggcatatctg 300
cagatcacca gcctcacggc tgaggacact ggcatgtatt tctgtgtgag agtcggctac 360
gatgctttgg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctcagg tgagtggatc 420
c                                                                   421
```

<210> 82

<211> 117

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Pidilizumab ağır zincir değişken sahası

<400> 82

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

<210> 83

<211> 384

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Pidilizumab hafif zincir değişken sahası

<400> 83

```
atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
aaatgtgaaa ttgtgttgac gcagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgcagtgc caggtcaagt gtaagttaca tgcactggtt ccagcagaaa 180
ccagggaaag cccctaagct ctggatctat aggacatcca acctggcttc tggggtccca 240
tctagattca gcggcagtgg atctgggaca tcttactgtc tcaccatcaa cagcctgcag 300
cctgaagatt ttgcaactta ctattgccag caaaggagta gtttcccact cacgttcggc 360
ggagggacca agctggagat caaa                                        384
```

<210> 84

<211> 106

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Pidilizumab hafif zincir değişken sahası

<400> 84

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

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Pidilizumab VH CDR1

<400> 85

```
Asn Tyr Gly Met Asn
 1               5
```

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Pidilizumab VH CDR2

<400> 86

```
Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
 1               5                  10                  15
Gly
```

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Pidilizumab VH CDR3

<400> 87

```
Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr
 1               5
```

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Pidilizumab VL CDR1

<400> 88

```
Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1               5                  10
```

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Pidilizumab VL CDR2

<400> 89

```
Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1               5
```

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Pidilizumab VL CDR3

<400> 90

```
Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
 1               5
```

<210> 91

<211> 369

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> BMS-936559 ağır zincir değişken bölgesi

<400> 91

```
caggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaaga cttctggaga caccttcagc acctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatccctа tatttggtaa agcacactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240


atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attttgtgtc gagaaagttt 300
cactttgttt cggggagccc cttcggtatg gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360
gtctcctca                                                        369
```

<210> 92

<211> 123

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> BMS-936559 ağır zincir değişken bölgesi

<400> 92

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

<210> 93

<211> 318

<212> DNA

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> BMS-936559 hafif zincir değişken bölgesi

<400> 93

```
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgaccgt cggccaaggg 300
accaaggtgg aaatcaaa                                               318
```

<210> 94

<211> 106

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> BMS-936559 hafif zincir değişken bölgesi

<400> 94

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

```
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
                85                  90                  95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 95

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> BMS-936559 VH CDR1

<400> 95

```
Thr Tyr Ala Ile Ser Trp
 1               5
```

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> BMS-936559 VH CDR2

<400> 96

```
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1               5                  10                  15
Gly
```

<210> 97

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> BMS-936559 VH CDR3

<400> 97

```
Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
 1               5                  10
```

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> BMS-936559 VL CDR1

<400> 98

```
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1               5                  10
```

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> BMS-936559 VL CDR2

<400> 99

```
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1               5
```

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> BMS-936559 VL CDR3

<400> 100

```
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 1               5
```

<210> 101

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEDI4736 ağır zincir değişken bölgesi

<400> 101

```
gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggcgga ctggtgaagc ctggcggctc cctgagactg 60
tcttgcgccg ccagtggctt tacattcagt acctactcca tgaactgggt ccgccaggca 120
ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtcctcc atctcatcca gtggcgacta catctactac 180
gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcagatga actccctgag agccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg 300
gtgacatcca tggtggcctt cgactactgg ggtcagggca ctctcgtcac agtgtcctct 360
```

<210> 102

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEDI4736 ağır zincir değişken bölgesi

<400> 102

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


                85                  90                  95
Ala Arg Asp Leu Val Thr Ser Met Val Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 103

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEDI4736 hafif zincir değişken bölgesi

<400> 103

```
tcttacgagc tgacccagcc tccttccgtg tccgtgtctc caggacagac ggccagaatc 60
acctgttccg gcgacgccct gcctcagaaa tacgtgttct ggtatcagca gaagtccggc 120
caggcccctg tgctggtgat ctacgaggac tccaagcggc cttccggcat ccctgagcgg 180
ttctccggct cctcttccgg caccatggcc accctgacca tctctggcgc ccaggtggag 240
gacgaggccg actactactg ctactccacc gacagatccg gcaaccacag agtgtttggt 300
ggggqtacta agctgacogt gctg                                        324
```

<210> 104

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEDI4736 hafif zincir değişken bölgesi

<400> 104

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

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEDI4736 VH CDR1

<400> 105

```
Thr Tyr Ser Met Asn
 1               5
```

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEDI4736 VH CDR2

<400> 106

```
Ser Ile Ser Ser Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1               5                  10                  15
Gly
```

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEDI4736 VH CDR3

<400> 107

```
Asp Leu Val Thr Ser Met Val Ala Phe Asp Tyr
 1               5                  10
```

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEDI4736 VL CDR1

<400> 108

```
Ser Gly Asp Ala Leu Pro Gln Lys Tyr Val Phe
 1               5                  10
```

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEDI4736 VL CDR2

<400> 109

```
Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1               5
```

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEDI4736 VL CDR3

<400> 110

```
Tyr Ser Thr Asp Arg Ser Gly Asn His Arg Val
 1               5                  10
```

<210> 111

<211> 1446

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> çözünür rHuPH20 "öncüsü"nü kodlayan DNA

<400> 111

```
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccaga 240
ataaacgcca ccggggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaaccoggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttt gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac                                                          1446
```

<210> 112

<211> 433

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MPDL3280A ağır zincir tam uzunluğu

<400> 112

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

<210> 113

<211> 212

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MPDL3280A hafif zincir tam uzunluğu

<400> 113

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


            100                 105                 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
        115                 120                 125
Ala Ser Trp Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
    130                 135                 140
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
145                 150                 155                 160
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
                165                 170                 175
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
            180                 185                 190
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
        195                 200                 205
Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 114

<211> 118

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MPDL3280A ağır zincir değişken bölgesi

<400> 114

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

<210> 115

<211> 108

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MPDL3280A hafif zincir değişken bölgesi

<400> 115

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 116

<211> 10

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MPDL3280A VH CDR1

<400> 116
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 117

<211> 18

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MPDL3280A VH CDR2

<400> 117
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MPDL3280A VH CDR3

<400> 118
Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MPDL3280A LH CDR1

<400> 119
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MPDL3280A LH CDR2

<400> 120

```
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1               5
```

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Bilinmiyor

<220>

<223> MPDL3280A LH CDR3

<400> 121

```
Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
 1               5
```

<210> 122

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Olgun PH20

<400> 122

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

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

<210> 123

<211> 447

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-482

<400> 123

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

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

<210> 124

<211> 446

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-481

<400> 124

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

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

<210> 125

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-480

<400> 125

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

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

<210> 126

<211> 444

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-479

<400> 126

```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
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> 127

<211> 443

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-478

<400> 127

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

```
    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> 128

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-477

<400> 128

```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
```

```
            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> 129

<211> 432

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 olgun 36-467

<400> 129

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

<210> 130

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 olgun 36-483

<400> 130

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

<210> 131

<211> **464**

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> olgun PH20 36-499

<400> 131

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


Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
    450                 455                 460
```

<210> 132

<211> 462

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-497

<400> 132

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

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

<210> 133

<211> 460

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-495

<400> 133

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

```
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
            355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
        370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435                 440                 445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile
    450                 455                 460
```

<210> 134

<211> 458

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-493

<400> 134

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

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

<210> 135

<211> 456

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-491

<400> 135

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

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

<210> 136

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-489

<400> 136

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

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

<210> 137

<211> 455

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-490

<400> 137

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

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

<210> 138

<211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-487

<400> 138

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

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

<210> 139

<211> 450

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-485

<400> 139

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

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

<210> 140

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-484

<400> 140

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

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

<210> 141

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-476

<400> 141

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

<210> 142

<211> 440

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-475

<400> 142

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

435                 440
```

<210> 143

<211> 439

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-474

<400> 143

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

                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu
        435
```

<210> 144

<211> 438

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-473

<400> 144

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


    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met
        435
```

<210> 145

<211> 437

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-472

<400> 145

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

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

<210> 146

<211> 436

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-471

<400> 146

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

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

<210> 147

<211> 435

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-470

<400> 147

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

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

<210> 148

<211> 434

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-469

<400> 148

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

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

<210> 149

<211> 433

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-468

<400> 149

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

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

<210> 150

<211> 431

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-466

<400> 150

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

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

<210> 151

<211> 430

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-465

<400> 151

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

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

<210> 152

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-500

<400> 152

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

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

<210> 153

<211> 463

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-498

<400> 153

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

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

<210> 154

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-496

<400> 154

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

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

<210> 155

<211> 459

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-494

<400> 155

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

<210> 156

<211> 457

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-492

<400> 156

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

```
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr
    450                 455
```

<210> 157

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-488

<400> 157

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

```
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435                 440                 445
Ala Ser Pro Ser Thr
    450
```

<210> 158

<211> 451

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-486

<400> 158

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

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

<210> 159

<211> 509

<212> PRT

<213> Pan troglodyte (Şempanze)

<220>

<223> Öncü şempanze PH20 XP_527873

<400> 159

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

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

<210> 160

<211> 474

<212> PRT

<213> Pan troglodyte

<220>

<223> olgun şempanze PH20 XP_527873

<400> 160

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

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

<210> 161

<211> 477

<212> PRT

<213> Macaca mulatta (Hint şebeği)

<220>

<223> olgun Hint şebeği PH20 EHH17639

<400> 161

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

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

<210> 162

<211> 475

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis (yengeç yiyen şebek)

<220>

<223> olgun Sinomolgus maymunu PH20 P38568.1

<400> 162

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

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

<210> 163

<211> 518

<212> PRT

<213> Bos taurus (sığır)

<220>

<223> Olgun inek PH20

<400> 163

```
Leu Asp Phe Arg Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
```

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

<210> 164

<211> 439

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> olgun inek PH20 AAP55713

<400> 164

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

                405                 410                 415
Lys Asn Val His Ser Val Asp Val Cys Met Ala Glu Asp Val Cys Ile
            420                 425                 430
Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro
        435
```

<210> 165

<211> 477

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Olgun fare PH20 NP_001073344.1

<400> 165

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

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

<210> 166

<211> 477

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus (kahverengi keme)

<220>

<223> Olgun sıçan PH20 NP_446419.1

<400> 166

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

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

<210> 167

<211> 510

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus (Ada tavşanı)

<220>

<223> Olgun tavşan PH20 NP_001076141.1

<400> 167

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

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

<210> 168

<211> 494

<212> PRT

<213> Cavia porcellus (kobay)

<220>

<223> olgun kobay PH20 NP_001166492.1

<400> 168

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

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

<210> 169

<211> 540

<212> PRT

<213> Vulpes vulpes (Kızıl tilki)

<220>

<223> Öncü Kızıl Tilki PH20

<400> 169

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

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

<210> 170

<211> 505

<212> PRT

<213> Vulpes vulpes

<220>

<223> Olgun Kızıl Tilki PH20 Q29152

<400> 170

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

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

<210> 171

<211> 331

<212> PRT

<213> Vespula vulgaris (Yaban arısı)

<220>

<223> Avrupa eşek arısı hiyalüronidaz

<400> 171

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

<210> 172

<211> 340

<212> PRT

<213> Vespula vulgaris

<220>

<223> Avrupa eşek arısı hiyalüronidaz

<400> 172

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

<210> 173

<211> 382

<212> PRT

<213> Apis mellifera (Avrupa bal arısı)

<220>

<223> bal arısı hiyalüronidaz

<400> 173

```
Met Ser Arg Pro Leu Val Ile Thr Glu Gly Met Met Ile Gly Val Leu
 1               5                  10                  15
Leu Met Leu Ala Pro Ile Asn Ala Leu Leu Leu Gly Phe Val Gln Ser
            20                  25                  30
Thr Pro Asp Asn Asn Lys Thr Val Arg Glu Phe Asn Val Tyr Trp Asn
        35                  40                  45
Val Pro Thr Phe Met Cys His Lys Tyr Gly Leu Arg Phe Glu Glu Val
    50                  55                  60
Ser Glu Lys Tyr Gly Ile Leu Gln Asn Trp Met Asp Lys Phe Arg Gly
65                  70                  75                  80
Glu Glu Ile Ala Ile Leu Tyr Asp Pro Gly Met Phe Pro Ala Leu Leu
                85                  90                  95
Lys Asp Pro Asn Gly Asn Val Val Ala Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln
            100                 105                 110
Leu Gly Asn Leu Thr Lys His Leu Gln Val Phe Arg Asp His Leu Ile
        115                 120                 125
Asn Gln Ile Pro Asp Lys Ser Phe Pro Gly Val Gly Val Ile Asp Phe
    130                 135                 140
Glu Ser Trp Arg Pro Ile Phe Arg Gln Asn Trp Ala Ser Leu Gln Pro
145                 150                 155                 160
Tyr Lys Lys Leu Ser Val Glu Val Val Arg Arg Glu His Pro Phe Trp
                165                 170                 175
Asp Asp Gln Arg Val Glu Gln Glu Ala Lys Arg Arg Phe Glu Lys Tyr
            180                 185                 190
Gly Gln Leu Phe Met Glu Glu Thr Leu Lys Ala Ala Lys Arg Met Arg
        195                 200                 205
Pro Ala Ala Asn Trp Gly Tyr Tyr Ala Tyr Pro Tyr Cys Tyr Asn Leu
    210                 215                 220
Thr Pro Asn Gln Pro Ser Ala Gln Cys Glu Ala Thr Thr Met Gln Glu
225                 230                 235                 240
Asn Asp Lys Met Ser Trp Leu Phe Glu Ser Glu Asp Val Leu Leu Pro
                245                 250                 255
Ser Val Tyr Leu Arg Trp Asn Leu Thr Ser Gly Glu Arg Val Gly Leu
            260                 265                 270
Val Gly Gly Arg Val Lys Glu Ala Leu Arg Ile Ala Arg Gln Met Thr
        275                 280                 285
Thr Ser Arg Lys Lys Val Leu Pro Tyr Tyr Trp Tyr Lys Tyr Gln Asp
    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> 174

<211> 331

<212> PRT

<213> Dolichovespula maculata

<220>

<223> white-faced hornet hiyalüronidaz

<400> 174

```
Ser Glu Arg Pro Lys Arg Val Phe Asn Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr
 1               5                  10                  15
Phe Met Cys His Gln Tyr Gly Leu Tyr Phe Asp Glu Val Thr Asn Phe

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

<210> 175

<211> 367

<212> PRT

<213> Polistes annularis

<220>

<223> kâğıt arısı hiyalüronidaz

<400> 175

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

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

<210> 176

<211> 450

<212> PRT

<213> Bos taurus (Sığır)

<220>

<223> büyükbaş hayvan hiyalüronidaz

<400> 176

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

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> 177

<211> 553

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> büyükbaş hayvan (PH20 öncü)

<400> 177

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

```
                100                 105                 110
Gly Gly Ile Pro Gln Leu Gly Asn Leu Lys Ser His Met Glu Lys Ala
            115                 120                 125
Lys Asn Asp Ile Ala Tyr Tyr Ile Pro Asn Asp Ser Val Gly Leu Ala
    130                 135                 140
Val Ile Asp Trp Glu Asn Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys
145                 150                 155                 160
Pro Lys Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Gln Lys
                165                 170                 175
Asn Pro Gln Leu Ser Phe Pro Glu Ala Ser Lys Ile Ala Lys Val Asp
            180                 185                 190
Phe Glu Thr Ala Gly Lys Ser Phe Met Gln Glu Thr Leu Lys Leu Gly
        195                 200                 205
Lys Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp
    210                 215                 220
Cys Tyr Asn His Asn His Asn Gln Pro Thr Tyr Asn Gly Asn Cys Pro
225                 230                 235                 240
Asp Val Glu Lys Arg Arg Asn Asp Asp Leu Glu Trp Leu Trp Lys Glu
                245                 250                 255
Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asn Ile Arg Leu Lys Ser
            260                 265                 270
Thr Gln Asn Ala Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Gln Glu Ala Ile
        275                 280                 285
Arg Leu Ser Lys Ile Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val
    290                 295                 300
Tyr Ala Arg Pro Val Phe Thr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ser Gln
305                 310                 315                 320
Gly Asp Leu Val Asn Ser Val Gly Glu Ile Val Ser Leu Gly Ala Ser
                325                 330                 335
Gly Ile Ile Met Trp Gly Ser Leu Asn Leu Ser Leu Ser Met Gln Ser
            340                 345                 350
Cys Met Asn Leu Gly Thr Tyr Leu Asn Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile
        355                 360                 365
Ile Asn Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys His
    370                 375                 380
Asn Glu Gly Val Cys Thr Arg Lys His Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu
385                 390                 395                 400
His Leu Asn Pro Met Asn Phe Ala Ile Gln Thr Gly Glu Gly Gly Lys
                405                 410                 415
Tyr Thr Val Pro Gly Thr Val Thr Leu Glu Asp Leu Gln Lys Phe Ser
            420                 425                 430
Asp Thr Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ala Asn Ile His Cys Lys Lys Arg
        435                 440                 445
Val Asp Ile Lys Asn Val His Ser Val Asn Val Cys Met Ala Glu Asp
    450                 455                 460
Ile Cys Ile Asp Ser Pro Val Lys Leu Gln Pro Ser Asp His Ser Ser
465                 470                 475                 480
Ser Gln Glu Ala Ser Thr Thr Thr Phe Ser Ser Ile Ser Pro Ser Thr
                485                 490                 495
Thr Thr Ala Thr Val Ser Pro Cys Thr Pro Glu Lys His Ser Pro Glu
            500                 505                 510
Cys Leu Lys Val Arg Cys Ser Glu Val Ile Pro Asn Val Thr Gln Lys
        515                 520                 525
Ala Cys Gln Ser Val Lys Leu Lys Asn Ile Ser Tyr Gln Ser Pro Ile
    530                 535                 540
Gln Asn Ile Lys Asn Gln Thr Thr Tyr
545                 550
```

<210> 178

<211> 474

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> öncü inek PH20

<400> 178

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

5

```
Val Cys Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro
465                 470
```

<210> 179

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> öncü PH20 varyantı P48A

<400> 179

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

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

<210> 180

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> öncü PH20 varyantı L499W

<400> 180

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

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

<210> 181

<211> 2105

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<223> büyükbaş hayvan PH20 DNA

<400> 181

```
ggtttatctc tgttcttggt gaggagacag acagaattga ctgctgtgct catccgcgag 60
ggtaaatgtg ctcagctctt tatggagtag tggagacggg cagagatgac aagatgaagc 120
aacttgcaaa acattcctaa atacgaagga agaagaatat ttaaatgtaa atcatcatta 180
ttcatttta tccatcaaag tggcttcatt ctgtgttcat atcttgcatc aaatattagg 240
tacaccaaag cgtgtaggag aaaaaagtgc ctttcacagt catcgctctt tgtgatgaga 300
atgctgaggc gccaccatat ctcctttcgg agctttgctg ggtctagcgg aacacccccag 360
gcagtgttca ccttcattat gcttccgtgt tgtttggctc tggacttcag agcacccact 420
cttatttcaa acacttcttt cctctgggcc tggaatgccc cagttgaacg ttgtgttaac 480
agaagatttc aactacctcc agatctgaga ctcttctctg taaaaggaag ccccagaaa 540
agtgctaccg gacaatttat tacattattt tatgctgata gacttggcta ctatcctcat 600
atagatgaaa aaacaggcaa aaccgtattc ggaggaattc cccagttggg aaacttaaaa 660
agtcatatgg agaaagcaaa aaatgacatt gcctattaca taccaaatga cagcgtgggc 720
ttggcggtca ttgactggga aaactggagg cctacctggg caagaaactg gaaacctaaa 780
gatgtttaca gggatgagtc agttgagttg gttctgcaaa aaaatccgca actcagtttc 840
ccagaggctt ccaagattgc aaaagtggat tttgagacag caggaaagag tttcatgcaa 900
gagactttaa aactgggaaa attacttcgg ccaaaatcact tatggggtta ttatcttttt 960
cctgattgtt acaatcataa tcataaccaa cctacttaca atggaaattg ccctgatgta 1020
gaaaaaagga gaaatgatga tctcgagtgg ttgtggaagg aaagcactgc ccttttccct 1080
tctgtttatt tgaatatcag gttaaaatct actcaaaatg ctgccttgta tgttcgtaat 1140
cgtgtccagg aagccattcg gttgtctaaa atagcgagtg tcgaaagtcc acttccggtt 1200
tttgtatatg cccgtccagt ttttactgat gggtcttcaa catatctttc tcagggtgac 1260
cttgtgaatt cggttggtga gatcgtttct ctaggtgcct ctgggattat aatgtggggc 1320
agtctcaatc taagcttatc tatgcaatct tgcatgaacc taggcactta cttgaacact 1380
acactgaatc cttacataat caacgtcacc ctagccgcca aaatgtgcag ccaagtgctt 1440
tgccacaatg aaggagtgtg tacaaggaaa cactggaatt caagcgacta tcttcacctg 1500
aacccaatga attttgctat tcaaactggg gaaggtggaa aatacacagt acctgggaca 1560
```

```
gtcacacttg aagacttgca aaagttttct gatacatttt attgcagttg ttatgccaac 1620
atccactgta agaagagagt tgatataaaa aatgttcata gtgttaacgt gtgtatggca 1680
gaagacattt gtatagacag ccctgtgaag ttacaacoca gtgatcattc ctccagccag 1740
gaggcatcta ctaccacctt cagcagtatc tcacoctcca ctacaactgc cacagtatct 1800
ccatgtactc ctgagaaaca atccoctgag tgcctcaaag tcaggtgttc ggaagtcatc 1860
cccaacgtca cccaaaaggc gtgtcaaagt gttaaattga agaacatttc ctatcagtca 1920
cctattcaaa atattaaaaa tcaaacaacc tattaaaatt aaattcagta aaaaaaaaaa 1980
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2040
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaag aaaaaaaaaa 2100
aaaaa                                                             2105
```

<210> 182

<211> 1971

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<223> büyükbaş hayvan Hyal1 DNA

<400> 182

```
ttggtgcgcc tggtgccaga cttaaggaac agaatcttgc tgatgcctgc acaggcoctc 60
gcoctggggt caggaagttt ggagaatgag gcctttcagc cttgaggttt coctacacct 120
gcoctgggct atggcagccc acttgcttcc tgtctgcacc ctgttcctga acttgctcag 180
catgacccaa ggctcccggg acoctgtggt ccccaaccag cccttcacta ccatctggaa 240
tgccaacacc gagtggtgta tgaagaaaca oggcgtggac gtagacatca gtatctttga 300
tgtggtgacc aacccggggc agaccttccg oggcoctaac atgaccattt tctacagctc 360
ccagctgggt acctacoctt actatacatc tgctggggag cctgtgtttg gtggcctgcc 420
ccagaatgcc agcctgaatg cccacctggc ccgcacattc caggacatcc tggctgccat 480
gcctgagcat cgcttctcag ggctggcagt cattgactgg gaggcatggc gcccgcgctg 540
ggccttcaac tgggacacca aggacattta ccggcagcgc tcacgggcat tggtacagaa 600
gcagcaccca gactggctag ctcctcgggt ggaggccgca gctcaggacc agttcgaggg 660
ggctgcagag gagtggatgg caggcacoct caagctggga caagcactgc gcoctcaggg 720
cctctggggc ttctataatt tccctgagtg ctacaactat gactttaaaa gtcccaacta 780
tacaggccgg tgtccactaa acatctgtgc ccagaatgac cagctcgggt ggctgtgggg 840
ccagagccgt gccctctacc ccagcatcta cctgcctgca gcactggagg gcacgaagaa 900
gacacagatg ttcgtgcagc accgtgtggc tgaggcattc cgtgtggcag cgggtgcggg 960
ggaccccaag ctgccggtgc tgccctacat gcagctcttc tacgacatga ctaaccactt 1020
tctgccogcg gaggagctgg agcacagcct ggggagagct gcagcccagg gtgcagcggg 1080
agtggtgctc tgggtgagct ggctgagcac aagcaccaag gaatcatgcc aggccatcaa 1140
ggagtatgtg gacacgacgc tgggaccctc catcctgaat gtgaccagcg gggctcgtct 1200
gtgcagtcag gtcctatgct ccggccatgg ccgttgtgcc cggcgcccca gttaccccaa 1260
ggccogcctc atcctcaact ccaccagttt ttccatcaag cctacacctg gtggtgggcc 1320
cctgacccta caaggtgccc tctcgctcga ggatcggttg cggatggcag tggagttcga 1380
atgtcgctgc taccgtgggt ggagggggac acggtgtgag cagtggggca tgtggtgatt 1440
ggcatgggca ogcactgagt acctgatgca agctgggcct ggctaggtag ggctttccca 1500
agtccaggca gtcacaggag tcatggttac agtcagaagt ccactcagcc agtgtcatga 1560
gcatacacca gtgtgcacac ctgcttacag accaagatag ctgcataagg acacggtgtg 1620
agcagtgggg catatgctga ttggcatggg cacacactga gtacctgatg caatctgggc 1680
ctggctaggg ctttcccaag tccaggcagt cacaggagtc atggttaggc atccagtcac 1740
aggagtcatg tcaggcatcc tgccgacaga gtcaaaaata cttcctctgg agacactgag 1800
tcagtcttca aacagaagca gtcacaagca ctgacattcg ggacttccct ggccatccag 1860
tggttaagac acggagcttc cactgcaggg ggcacgggca gagactaaga tcacgaatgc 1920
taagcggtgc ggttaaacaa atcacaaata aataaactga cattcactgg g           1971
```

<210> 183

<211> 1912

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<223> büyükbaş hayvan Hyal2 DNA

<400> 183

caagtcgccg gcgggctgcc caaagggcag gagctggcgc gaatagcttg gctagagact 60
tacccccggga aggagggagg ccgccgacct actgggccga cggactccca cacagttcct 120
gagctggtgc ctggcaggtg acactgactt cctgcagccc ccagcatgtg gacaggcctg 180
ggccccgccg tcacactggc cctggtgttg gtggtggcat gggccacgga gctgaagccc 240
acagcaccac ccatcttcac gggccggccc tttgtggtcg catgggatgt gcccacacag 300
gactgtggcc cgcgccacaa gatgccattg gacccaaagg acatgaaggc ctttgatgtt 360
caggcttcac ctaacgaggg ttttgtaaat cagaacatca ccatcttcta ccgtgaccgg 420
ctgggcatgt atccacactt caattcggtg gggaggtcag tacatggtgg tgtgccacag 480
aatggcagcc tctgggtaca cctggagatg ctgaagggac acgtggaaca ctacattcgt 540
acacaggagc ctgcagggct ggcagtcatc gactgggagg actggcggcc agtgtgggtg 600
cgcaactggc aggacaagga tgtgtaccgc cgattatcac gccatttggt agccattcgc 660
cacccctgatt ggccaccaga gcgcgtagcc aaggaggcgc agtatgagtt tgagttcgct 720
gcacggcagt tcatgctgga gacattgcga tttgtcaagg cgtttcggcc tcggcaccta 780
tggggcttct acctcttccc tgactgttac aaccatgatt atgtgcagaa ctgggagacc 840
tatacaggcc gctgccctga tgttgaggtc tccccaaatg accagctggc ctggctctgg 900
gccgagagca cggccctctt ccctctgtcc tacttggaag agacactggc ttcctccact 960
cacggccgca actttgtcag ctttcgtgtc caggaggctc ttcgcgtggc tgacgtccac 1020
catgccaacc atgcactccc cgtctacgtc ttcacgaggc ccacctatag ccgtggactc 1080
acagggctta gcgagatgga tctcatctcc accattggtg agagtgctgc cctgggtgca 1140
gctggcgtca tcctctgggg tgacgcaggg tttaccacca gcaacgagac ctgccgacgc 1200
ctcaaggatt atctgactcg gtcattggta ccctatgtcg tcaatgtgtc ctgggctgcc 1260
cagtactgca gctgggccca gtgccatggc catgggcgct gtgtgcgccg ggaccccaac 1320
gctcacacct tcctgcacct cagtgccagc agcttccgtc tagtgcctag ccacgcacct 1380
gatgagccgc ggctgcgacc agaggggtaa ctcagttggg ccgaccgcaa ccacctacag 1440
atgcactttc gctgccagtg ctacttaggc tgggcggtg agcaatgcca gtgggaccgc 1500
aggcgggcag ctgggggtgc cagtggggcc tgggctgggt cccacctcac tggcctgctg 1560
gcagtggcag tcctggcctt cacctagact ttgtaaggat ctctcaccca gctgccacgc 1620
cagctggcct ctgccacaag gggtctgtca ggcatgtagg agcctgcaag gggtggacaa 1680
accagagtct ggaggggcag agccctctgg gatgcctggt aggatgtcct taccagctcc 1740
cacccccgt tctaaggggg aggggcagtc ccctggaagg ccccgtctct ccctgccaga 1800
gaggaagagg ggcacagctg ggccggggag gacctgaccc tactccccg ccccgtggata 1860
gtttattatt attattttgg ggtctctttt gtaaattaaa tataaaacaa ct 1912

<210> 184

<211> 476

<212> PRT

<213> Ovis aries (koyun)

<220>

<223> koyun (Ovis aries) hiyalüronidaz 2

<400> 184

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

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

<210> 185

<211> 114

<212> PRT

<213> Ovis aries

<220>

<223> koyun (Ovis aries) PH20 kısmi dizisi

<400> 185

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

            100                 105                 110
Ile Arg
```

<210> 186

<211> 520

<212> PRT

<213> Ovis aries

<220>

<223> koyun (Ovis aries) PH20 proteini

<400> 186

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

385                 390                 395                 400
Cys Ser Cys Tyr Ala Asn Ile Asn Cys Lys Lys Arg Val Asp Ile Lys
                405                 410                 415
Asn Val His Ser Val Asn Val Cys Met Ala Glu Asp Ile Cys Ile Glu
            420                 425                 430
Gly Pro Val Lys Leu Gln Pro Ser Asp His Ser Ser Ser Gln Asn Glu
        435                 440                 445
Ala Ser Thr Thr Thr Val Ser Ser Ile Ser Pro Ser Thr Thr Ala Thr
    450                 455                 460
Thr Val Val Ser Pro Cys Thr Pro Glu Lys Gln Ser Pro Glu Cys Leu
465                 470                 475                 480
Lys Val Arg Cys Leu Glu Ala Ile Ala Asn Val Thr Gln Thr Gly Cys
                485                 490                 495
Gln Gly Val Lys Trp Lys Asn Thr Ser Ser Gln Ser Gln Ser Ser Ile
            500                 505                 510
Gln Asn Ile Lys Asn Gln Thr Thr
        515                 520
```

<210> 187

<211> 517

<212> PRT

<213> Ovis aries

<220>

<223> koyun (Ovis aries) PH20 proteini

<400> 187

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

```
        275                 280                 285
Ser Val Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Ile Met Trp
    290                 295                 300
Gly Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Met Gln Ser Cys Met Asn Leu Gly
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Leu Asn Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys His Asp Glu Gly Val Cys
            340                 345                 350
Thr Arg Lys Gln Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Met
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Thr Gly Lys Gly Gly Lys Tyr Thr Val Pro Gly
    370                 375                 380
Lys Val Thr Leu Glu Asp Leu Gln Thr Phe Ser Asp Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ala Asn Ile Asn Cys Lys Lys Arg Val Asp Ile Lys Asn
                405                 410                 415
Val His Ser Val Asn Val Cys Met Ala Glu Asp Ile Cys Ile Glu Gly
            420                 425                 430
Pro Val Lys Leu Gln Pro Ser Asp His Ser Ser Ser Gln Asn Glu Ala
        435                 440                 445
Ser Thr Thr Thr Val Ser Ser Ile Ser Pro Ser Thr Thr Ala Thr Thr
    450                 455                 460
Val Ser Pro Cys Thr Pro Glu Lys Gln Ser Pro Glu Cys Leu Lys Val
465                 470                 475                 480
Arg Cys Leu Glu Ala Ile Ala Asn Val Thr Gln Thr Gly Cys Gln Gly
                485                 490                 495
Val Lys Trp Lys Asn Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ile Gln Asn Ile Lys
            500                 505                 510
Asn Gln Thr Thr Tyr
        515
```

<210> 188

<211> 1620

<212> DNA

<213> Ovis aries

<220>

<223> kodlayıcı koyun PH20

<400> 188

```
ttttccgtgt tggttggctc tggacttcag agcaccccct ctcatttcaa acacttcttt 60
cctctgggcc tggaatgccc cagctgaaag ttgtattaaa atctttaaac tacctccaga 120
tctgagactc ttctctgtaa aaggaagccc ccaaaaaagt gctacgggac aatttattac 180
attattttat gctgatagac ttggctacta tcctcatata gatgaaaaaa caggcaacac 240
tgtatatgga ggaattcccc agttgggaaa cttaaaaaat catttggaaa aagccaaaaa 300
agacattgcc tattacatac caaatgacag cgtgggcttg gcggtcattg actgggaaaa 360
ctggaggcct acctgggcaa gaaactggaa acctaaagat gtttacaggg atgagtctgt 420
tgagttggtt ctgcaaaaaa atccacaact cagtttccca gaggcttcca agattgcaaa 480
agtggatttt gagacagcag gaaagagttt catgcaagag actttaaaac tgggaaaatt 540
acttoggcca aatcacttat ggggttatta tcttttcct gattgttaca atcataatta 600
taaccagcct acttacaatg gaaattgctc tgatttagaa aaaaggagaa atgatgatct 660
cgactggttg tggaaggaaa gcactgcccc tttcccttct gtttatttga atatcaagtt 720
aaaatctact ccaaaagctg ccttctatgt tcgtaatcgt gtccaggaag ccattcggtt 780
gtctaaaata gcgagtgttg aaagtccact tcccgttttt gtatatcacc gtccagtttt 840
tactgatggg tcttcaacat acctttctca gggtgacctt gtgaattcgg ttggtgagat 900
cgttgctcta ggtgcctctg ggattataat gtggggcagt ctcaatctaa gcctaactat 960
gcaatcttgc atgaacctag gcaattactt gaacactaca ctgaatcctt acataatcaa 1020
cgtcacccta gcagccaaaa tgtgcagcca agtgctttgc cacgatgaag gagtgtgtac 1080
aaggaaacaa tggaattcaa gcgactatct tcaoctgaac ccaatgaatt ttgctattca 1140
aactgggaaa ggtggaaaat acacagtacc tgggaaagtc acacttgaag acctgcaaac 1200
gttttctgat aaattttatt gcagttgtta tgccaacatc aactgtaaga agagagttga 1260
```

tataaaaaat gttcatagtg ttaatgtatg tatggcagaa gacatttgta tagagggccc 1320
tgtgaagtta caacccagtg atcattcctc tagccagaat gaggcatcta ctaccaccgt 1380
cagcagtatc tcacccctca ctacagccac cacagtatct ccatgtactc ctgagaaaca 1440
gtcccctgag tgcctcaaag tcaggtgttt ggaagccatc gccaacgtca cccaaacggg 1500
gtgtcaaggt gttaaatgga agaacacttc cagtcagtca agtattcaaa atattaaaaa 1560
tcaaacaacc tattaaaata taaattcagt gcttataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620

<210> 189

<211> 1537

<212> DNA

<213> Ovis aries

<220>

<223> kodlayıcı koyun Hyal2

<400> 189

gcaaatgaca ctgacttcct gcagcccaca gcatgtggac aggcctgggc cccgccgtca 60
cactggccct ggtgttggtg gtggcatggg ccacagagct gaagcccaca gcaccaccca 120
tcttcacggg ccggcccttt gtggttgcat gggatgtgcc cacacaggac tgtggcccac 180
gccacaagat gccattggac ccaaaggaca tgaaggcctt tgatgtgcag gcctcaccta 240
acgagggttt tgtaaatcag aacatcacca tcttctaccg tgaccggctg ggcatgtatc 300
cacacttcaa ctcggtgggg aggtcagtcc atggtggtgt gccacagaat ggcagcctct 360
gggtacacct ggagatgctg aagggacacg tggaacacta cattcgtaca caggagcctg 420
cagggctggc agtcatcgac tgggaggact ggcggccagt gtgggtgcgc aactggcagg 480
acaaggatgt gtaccgccga ttatcacgcc agttggtggc cagtcaccac cccgattggc 540
caccagagcg catagtcaag gaggcgcagt atgagtttga gttcgctgca cggcagttca 600
tgctggagac actgcgattt gtcaaggcgt ttcggcctcg gcacctatgg ggcttctacc 660
tcttcctga ctgttacaac catgattatg tgcaaaactg ggagacctat acaggccgct 720
gccctgatgt tgaggtctcc cgaaatgacc agctgtcctg gctctgggcc gagagcacag 780
ccctcttccc ctctgtctac ctggaagaga cgctggcttc ctccactcac ggccgcaact 840
ttgtcagctt tcgtgtccag gaggctcttc gcgtggctga cgtccaccat gccaaccatg 900
cactcccagt ctacgtcttc acgaggccca cctacagccg tggactcaca gggcttagcg 960
agatggatct catctccacc attggtgaga gtgctgccct gggtgcagcc ggcgtcatcc 1020
tctggggtga cgcagggttt accaccagca acgagacctg ccgacgcctc aaggattatc 1080
tgactcggtc actggtaccc tatgtcgtca atgtgtcctg ggctgccccag tactgcagct 1140
gggcccagtg ccatggccat gggcgctgtg tgcgccggga ccccaacgct cacaccttcc 1200
tgcacctcag tgccagcagc ttccgtctag tgcctagcca cgcacctgat gagccgcggc 1260
tgcgaccaga gggggagctc agttgggccg accgcaacca cctacagacg cactttcgct 1320
gccagtgcta cttaggctgg ggcggtgagc agtgccagtg ggaccgcagg cgggcagctg 1380
ggggtgccag tggggcctgg gctgggtccc acctcactgg cctgctggca gtggcagtcc 1440
tggccattcac atggacttcg taagggtctc accccagctgc cagggccagct ggcctctgcc 1500
acaaggggtc tgccaggcat gtagcagccc acaaggg 1537

<210> 190

<211> 1967

<212> DNA

<213> Ovis aries

<220>

<223> kodlayıcı koyun Hiyalüronidaz

<400> 190

```
actcctgttt atctctgttc ttggtgagga gacagacaga attgactgct gtgctcatcc 60
accaggttac agatgaagca acttgcaaaa cattcctaaa tacgaaggaa gaagagtatt 120
taaacgtaaa tcatcattat tcatttttat ccatcaaagt agcttcattc tgtgttccta 180
tcttgcatca aatattaggt aaaccaaagt gtgtaggaga aaaaagtgct tttcatagtc 240
atcgctcttt gtgaagagaa tgctaaggcg ccgccatatc tcctttagga gctttgttgg 300
ggccagtgga acacccccagg cggcgctcgc cttccttctg cttccatgtt ggttggctct 360
ggacttcaga gcacccccctc ttatttcaaa cacttctttc ctctgggcct ggaatgcccc 420
agctgaacgt tgtgttaaaa tctttaaact acctccagat ctgagactct tctctgtaaa 480
aggaagcccc caaaaaagtg ctacgggaca atttattaca ttattttatg ctgatagact 540
tggctactat cctcatatag atgaaaaaac aggcaacacc gtatatggag gaattcccca 600

gttgggaaac ttaaaaaatc atttggaaaa agccaaaaaa gacattgcct attatatacc 660
aaatgacagc gtgggcttgg cggtcattga ctgggaaaac tggaggccta cctgggcaag 720
aaactggaaa cctaaagatg tttacaggga tgagtctgtt gagttggttc tgcaaaaaaa 780
tccacaactc agtttcccag aggcttccaa gattgcaaaa gtggattttg agacagcagg 840
aaagagtttc atgcaagaga ctttaaaact gggaaaatta cttcggccaa atcacttatg 900
gggttattat ctttttcctg attgttacaa tcataattat aaccagccta cttacaatgg 960
aaattgctct gatttagaaa aaaggagaaa tgatgatctc gactggttgt ggaaggaaag 1020
cactgccctt ttcccttctg tttatttgaa tatcaagtta aaatctactc caaaagctgc 1080
cttctatgtt cgtaatcgtg tccaggaagc cattcggttg tctaaaatag cgagtgttga 1140
aagtccactt ccggtttttg tatatcaccg tccagttttt actgatgggt cttcaacata 1200
cctttctcag ggtgaccttg tgaattcggt tggtgagatc gttgctctag gtgcctctgg 1260
gattataatg tggggcagtc tcaatctaag cctaactatg caatcttgca tgaacctagg 1320
caattacttg aacactacac tgaatcctta cataatcaac gtcaccctag cagccaaaat 1380
gtgcagccaa gtgctttgcc acgatgaagg agtgtgtaca aggaaacaat ggaattcaag 1440
cgactatctt cacctgaacc caatgaattt tgctattcaa actgggaaag gtggaaaata 1500
cacagtacct gggaaagtca cacttgaaga cctgcaaacg ttttctgata aattttattg 1560
cagttgttat gccaacatca actgtaagaa gagagttgat ataaaaaatg ttcatagtgt 1620
taatgtatgt atggcagaag acatttgtat agagggccct gtgaagttac aacccagtga 1680
tcattcctct agccagaatg aggcatctac taccaccgtc agcagtatct cacccctctac 1740
tacagccacc acagtatctc catgtactcc tgagaaacag tcccctgagt gcctcaaagt 1800
caggtgtttg gaagccatcg ccaacgtcac ccaaacgggg tgtcaaggtg ttaaatggaa 1860
gaacacttcc agtcagtcaa gtattcaaaa tattaaaaat caaacaacct attaaaatat 1920
aaattcagtg cttattaaga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa              1967
```

<210> 191

<211> 435

<212> PRT

<213> Sus scrofa (Yaban domuzu)

<220>

<223> domuz hiyalüronidaz

<400> 191

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


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

<210> 192

<211> 419

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

<223> domuz hiyalüronidaz 3

<400> 192

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

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

<210> 193

<211> 462

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> fare hiyalüronidaz

<400> 193

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

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

<210> 194

<211> 473

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> fare hiyalüronidaz 2

<400> 194

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

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

<210> 195

<211> 412

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> fare hiyalüronidaz 3

<400> 195

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

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

<210> 196

<211> 512

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Öncü fare PH20

<400> 196

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

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

<210> 197

<211> 529

<212> PRT

<213> Cavia porcellus

<220>

<223> Öncü kobay PH20

<400> 197

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

                485                 490                 495
Thr Ser Ser Ala Pro Pro Ser Ser His Ile Leu Pro Lys Asp Leu Ser
            500                 505                 510
Trp Cys Leu Phe Leu Leu Ser Ile Phe Ser Gln His Trp Lys Tyr Leu
        515                 520                 525
Leu
```

<210> 198

<211> 449

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> sıçan hiyalüronidaz 1

<400> 198

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

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

<210> 199

<211> 473

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> sıçan hiyalüronidaz 2

<400> 199

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

```
305                 310                 315                 320
Gly Ser Ala Gly Val Ile Phe Trp Gly Asp Ser Val Tyr Ala Ser Ser
                325                 330                 335
Met Glu Asn Cys Gln Asn Leu Lys Lys Tyr Leu Thr Gln Thr Leu Val
            340                 345                 350
Pro Tyr Ile Val Asn Val Ser Trp Ala Thr Gln Tyr Cys Ser Trp Thr
        355                 360                 365
Gln Cys His Gly His Gly Arg Cys Val Arg Arg Asn Pro Ser Ala Ser
    370                 375                 380
Thr Phe Leu His Leu Ser Pro Ser Ser Phe Arg Leu Val Pro Gly Arg
385                 390                 395                 400
Thr Pro Ser Glu Pro Gln Leu Arg Pro Glu Gly Glu Leu Ser Glu Asp
                405                 410                 415
Asp Leu Ser Tyr Leu Gln Met His Phe Arg Cys His Cys Tyr Leu Gly
            420                 425                 430
Trp Gly Gly Glu Gln Cys Gln Trp Asn His Lys Arg Ala Ala Gly Asp
        435                 440                 445
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> 200

<211> 412

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> sıçan hiyalüronidaz 3

<400> 200

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

```
                245                 250                 255
His Gln Thr Phe Val Arg His Arg Leu Glu Glu Ala Phe Arg Val Ala
            260                 265                 270
Leu Thr Gly His Ala His Pro Leu Pro Val Leu Ala Tyr Val Arg Leu
        275                 280                 285
Thr His Arg Ser Ser Gly Arg Phe Leu Ser Leu Asp Asp Leu Met Gln
    290                 295                 300
Thr Ile Gly Val Ser Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Val Leu Trp
305                 310                 315                 320
Gly Asp Leu Ser Val Ser Ser Ser Glu Glu Glu Cys Trp Arg Leu His
                325                 330                 335
Asp Tyr Leu Val Gly Thr Leu Gly Pro Tyr Val Ile Asn Val Thr Lys
            340                 345                 350
Ala Ala Thr Ala Cys Ser His Gln Arg Cys His Gly His Gly Arg Cys
        355                 360                 365
Ser Trp Lys Asp Pro Gly Gln Met Glu Ala Phe Leu His Leu Gln Pro
    370                 375                 380
Asp Asp Asn Leu Gly Ala Trp Lys Ser Phe Arg Cys Arg Cys Tyr Leu
385                 390                 395                 400
Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Leu Glu Pro Lys Pro
                405                 410
```

<210> 201

<211> 512

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> Öncü sıçan PH20

<400> 201

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

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

<210> 202

<211> 512

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<220>

<223> Öncü Hint Şebeği PH20

<400> 202

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

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

<210> 203

<211> 545

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<220>

<223> Öncü tavşan PH20

<400> 203

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

```
    50                  55                  60
Gly Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Leu Phe Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  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
```

<210> 204

<211> 510

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<220>

<223> Şempanze PH20

<400> 204

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

```
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Ser Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Asp
                485                 490                 495
Leu Cys Asp Leu Tyr Leu Val Pro Thr Ser Tyr Leu Ile Leu
            500                 505                 510
```

<210> 205

<211> 414

<212> PRT

<213> Pongo pygmaeus (Orangutan)

<220>

<223> Orangutan hiyalüronidaz 3

<400> 205

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

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

<210> 206

<211> 510

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<223> Öncü Sinomolgus maymunu PH20

<400> 206

```
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Ile Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asn Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Thr Leu Met Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Val Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Leu Thr Thr Gly Val Thr Val His Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Val Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ser Lys
        115                 120                 125
Gln Asp Ile Leu Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu 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> 207

<211> 491

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-491

<400> 207

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

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

<210> 208

<211> 492

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-492

<400> 208

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

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

<210> 209

<211> 493

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-493

<400> 209

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

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

<210> 210

<211> 494

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-494

<400> 210

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

485                 490
```

<210> 211

<211> 495

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-495

<400> 211

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

```
                405                 410                 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile
                485                 490                 495
```

<210> 212

<211> 496

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-496

<400> 212

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

```
                325                 330                 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
                485                 490                 495
```

<210> 213

<211> 497

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-497

<400> 213

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

```
                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
```

<210> 214

<211> 498

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-498

<400> 214

```
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
```

<210> 215

<211> 499

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-499

<400> 215

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

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

<210> 216

<211> 500

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-500

<400> 216

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

Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
                485                 490                 495
Ser Ile Leu Phe
            500
```

<210> 217

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beşeri (PH20 öncü) (1-509)

<400> 217

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

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

<210> 218

<211> 435

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hiyalüronidaz-1 [Öncü]

<400> 218

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

```
Ala Val Ala Ala Gly Asp Pro Asn Leu Pro Val Leu Pro Tyr Val Gln
        275                 280                 285
Ile Phe Tyr Asp Thr Thr Asn His Phe Leu Pro Leu Asp Glu Leu Glu
    290                 295                 300
His Ser Leu Gly Glu Ser Ala Ala Gln Gly Ala Ala Gly Val Val Leu
305                 310                 315                 320
Trp Val Ser Trp Glu Asn Thr Arg Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile
                325                 330                 335
Lys Glu Tyr Met Asp Thr Thr Leu Gly Pro Phe Ile Leu Asn Val Thr
            340                 345                 350
Ser Gly Ala Leu Leu Cys Ser Gln Ala Leu Cys Ser Gly His Gly Arg
        355                 360                 365
Cys Val Arg Arg Thr Ser His Pro Lys Ala Leu Leu Leu 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> 219

<211> 473

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hiyalüronidaz-2 [Öncü]

<400> 219

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

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

<210> 220

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hiyalüronidaz-3 [Öncü]

<400> 220

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

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

<210> 221

<211> 481

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hiyalüronidaz-4 [Öncü]

<400> 221

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

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

<210> 222

<211> 793

<212> PRT

<213> Arthrobacter türü

<220>

<223> Hiyalironan liyaz (suş FB24)

<400> 222

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

```
Ala Ile Asp Leu Leu Glu Arg Ser Ala Gly Arg Leu Thr Val Phe Ser
                85                  90                  95
Asp Leu Ser Leu Ala Lys Asp Thr Asp Leu Val Thr Thr His Thr Arg
            100                 105                 110
Leu Ala Thr Met Ala Thr Ala Trp Ala Thr Pro Gly Ser Glu His Phe
        115                 120                 125
Ala Asp Ala Gly Leu Leu Ala Ala Ile Arg Ala Gly Leu Ala Asp Ala
    130                 135                 140
Asn Ser Leu Cys Tyr Asn Ala Ser Lys Glu Glu Gln Gly Asn Trp Trp
145                 150                 155                 160
Ser Trp Glu Ile Gly Thr Pro Lys Ala Leu Ala Asp Thr Met Val Leu
                165                 170                 175
Leu His Ala Glu Leu Thr Ala Ala Glu Arg Ala Ala Tyr Cys Ala Ala
            180                 185                 190
Ile Asp His Phe Val Pro Asp Pro Trp Gln Gln Phe Pro Pro Lys Arg
        195                 200                 205
Gly Lys Ile Thr Ser Val Gly Ala Asn Arg Val Asp Leu Cys Gln Ala
    210                 215                 220
Val Thr Ile Arg Ser Leu Val Asp Glu Asp Ala Glu Lys Leu Thr His
225                 230                 235                 240
Ala Val Ala Gly Leu Ser Glu Val Trp Gln Tyr Val Ser Ala Gly Asn
                245                 250                 255
Gly Phe Phe Thr Asp Gly Ser Phe Ile Gln His Ser Thr Thr Pro Tyr
            260                 265                 270
Thr Gly Ser Tyr Gly Val Val Leu Leu Thr Gly Leu Ser Lys Leu Phe
        275                 280                 285
Ala Leu Leu Gly Gly Thr Gly Ala Glu Val Ser Asp Pro Ser Arg Asp
    290                 295                 300
Ile Leu Phe Lys Thr Val Glu Gly Ser Phe Ala Pro Phe Met Val Ala
305                 310                 315                 320
Gly Ala Met Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Glu Ser
                325                 330                 335
Asn Thr Gly Phe Asp Leu Gly Ala Ser Thr Ile Glu Ser Ile Leu Leu
            340                 345                 350
Leu Ala Arg Ala Val Asp Pro Val Thr Ala Arg Arg Trp Arg Ser Leu
        355                 360                 365
Cys Leu Ala Trp Ile Asn Gln Asn Arg Lys Ala Pro Ile Leu Ala Asp
    370                 375                 380
Ala Gly Val Gly Arg Thr Ala Leu Val Lys Glu Leu Leu Ala Met Gly
385                 390                 395                 400
Leu Thr Glu Thr Asp Leu Pro Gly Gly His Tyr Leu Phe Pro Ala Met
                405                 410                 415
Asp Arg Thr Met His His Ser Gln Gly Trp Thr Leu Ser Thr Ala Met
            420                 425                 430
Ala Ser Ser Arg Ile Ala Trp Tyr Glu Cys Gly Asn Gly Glu Asn Asn
        435                 440                 445
Arg Gly Tyr His Thr Gly Ser Gly Met Thr Tyr Val Tyr Asp Gly Asp
    450                 455                 460
Leu Gly Gln Tyr Asp Asp Ala Phe Trp Ala Thr Ala Asn His Cys Arg
465                 470                 475                 480
Leu Pro Gly Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Leu Pro Asp Lys Val Glu
                485                 490                 495
Gly Glu Trp Gly Ala Ala Thr Pro Ala Asn Glu Trp Thr Gly Ser Thr
            500                 505                 510
Ala Tyr Gly Asp Val Ala Ala Val Gly Gln His Leu Ile Gly Pro Gly
        515                 520                 525
Gly Thr Gly Leu Thr Ala Arg Lys Ser Trp Phe Val Ser Lys Asp Val
    530                 535                 540
Ile Val Cys Leu Gly Ala Asp Ile Arg Thr Gly Ser Gly Ser Arg Ile
545                 550                 555                 560
Glu Thr Val Val Asp His Arg Asn Leu His Ala Gly Phe Asn Ala Met
                565                 570                 575
Gly Thr Ala Ala Gly Thr Val Ala Ala Thr Pro Gly His Pro Glu Val
```

```
            580                 585                 590
Leu Thr Val Asp Arg Trp Val His Leu Glu Gly Phe Gly Gly Tyr Val
        595                 600                 605
Val Leu Asp Ala Ala Pro Leu Gln Val Leu Arg Glu Gln Arg Glu Gly
    610                 615                 620
Ser Trp Ser Glu Val Asn Val Lys Gly Ser Ala Ala Arg Gln Thr Arg
625                 630                 635                 640
Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Phe Asp His Gly His Glu Pro Glu Ala Ala
                645                 650                 655
Ser Tyr Ala Tyr Leu Val Ala Pro Gly Ala Ser Ala Ser Met Thr Ser
            660                 665                 670
Ser Leu Ser Gly Gln Ser Phe His Thr Val Leu Arg Asn Asp Glu Val
        675                 680                 685
Ala Gln Ala Val Lys Phe Lys Lys Glu Lys Thr Thr Ala Ala Thr Phe
    690                 695                 700
Trp Arg Pro Gly Thr Val Gly Asp Leu Ala Leu Ser Gly Pro Ala Cys
705                 710                 715                 720
Val Val Val Lys Glu Val Gly Asp Arg Leu Ser Ile Ala Val Ser Asp
                725                 730                 735
Pro Thr Gln Asn Ala Ser Thr Leu Thr Leu Arg Leu Lys Thr Lys Arg
            740                 745                 750
Phe Phe Arg Ile Ile Glu Gly Gln Gly Ala Ser Leu Ser His Gly Ala
        755                 760                 765
Asp Gly Phe Thr Val Leu Glu Val Asp Ile Ala Asn His Ala Gly Arg
    770                 775                 780
Thr Lys Gln Ile Glu Leu Ser Ala Glu
785                 790
```

<210> 223

<211> 557

<212> PRT

<213> Bdellovibrio bacteriovorus

<220>

<223> hiyalüronan liyaz

<400> 223

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

```
        195                 200                 205
Leu Leu Val Glu Ser Lys Glu Arg Leu Lys Ser Val Ala Leu Lys Gln
    210                 215                 220
Pro Ile Ala Leu Gly Leu Asp Thr Ser Leu Ala Gln Val Ser Leu Ser
225                 230                 235                 240
Leu Asn Arg Arg Ala Lys Asp Gly Tyr Ala Asn Tyr Ser Asp Lys Ala
                245                 250                 255
Ala Arg Ser Pro Arg Ala Asp Ala Tyr Leu Asp Asn Lys Pro Ala Asp
            260                 265                 270
Ser Lys Pro Ala Val Trp Trp Asn Val Lys Tyr Lys Asn Arg Trp Leu
        275                 280                 285
Ser Asp Gly Ser Val Leu Ser Gly Asn Pro Ile Phe Thr Asn Leu Ile
    290                 295                 300
Trp Asn Glu Ile Gly Arg Gly Ala Asp Leu His Glu Leu Glu Gln Trp
305                 310                 315                 320
Leu Ala Asp Asn Asp His Ile Ile Lys Glu Leu Thr Thr Ala Val Phe
                325                 330                 335
Ala Ser Glu Ala Pro His Ile Thr Asp Phe Tyr Pro Ala Glu Lys Ile
            340                 345                 350
Asp Leu Gly Arg Ala Lys Ala Gly Glu Gln Ile Phe Lys Asn Thr Cys
        355                 360                 365
Ala Lys Cys His Gly His Tyr Glu Lys Ala Trp Asn Leu Pro Gln Ala
    370                 375                 380
Leu Val Leu Ser Ala Ala Glu Arg Leu Lys Thr Val Glu Val Arg Tyr
385                 390                 395                 400
Lys Glu Lys Thr Pro Val Val Asn Val Gly Thr Asp Pro Phe Arg Arg
                405                 410                 415
Gln Gly Met Lys Ser Leu Glu Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ile Ser Lys
            420                 425                 430
Lys Asn Gly Ile Val Ile Lys Ala Gln Glu Gly Tyr Val Pro Pro Pro
        435                 440                 445
Leu Val Gly Ile Trp Ala Arg Trp Pro Tyr Met His Asn Asn Ser Ile
    450                 455                 460
Pro Asn Leu Cys Val Leu Leu Thr Pro Ala Lys Lys Arg Pro Ser Ile
465                 470                 475                 480
Tyr Tyr Ser Gly Glu Ala Leu Asn Lys Asp Thr Asp Tyr Asp Phe Ser
                485                 490                 495
Cys Gly Gly Tyr Pro Ile Gly Asp Lys Thr Pro Lys Ala Trp Lys Thr
            500                 505                 510
Arg Glu His Leu Tyr Asp Thr Arg Asn Pro Gly Met Gly Asn Met Gly
        515                 520                 525
His Asp Glu Gly Ile Phe Ile Lys Asp Gly Lys Glu Ile Leu Ser Ala
    530                 535                 540
Glu Asp Lys Tyr Asn Leu Ile Gln Phe Leu Gln Thr Leu
545                 550                 555
```

<210> 224

<211> 813

<212> PRT

<213> Propionibacterium acnes

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 224

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

```
    50                  55                  60
Ala Ile Ile Ala Lys Thr Asp Arg Lys Val Ala Glu Ile Leu Thr Asp
65                  70                  75                  80
Leu Val Ser Gly Ser Ser Arg Gln Thr Val Leu Ile Ser Ala Asp Leu
                85                  90                  95
Arg Lys Glu Gln Ser Pro Phe Ile Thr Lys Thr Ala Arg Ala Ile Glu
            100                 105                 110
Ser Met Ala Cys Ala Trp Ala Thr Pro Gly Ser Ser Tyr His Lys Asp
        115                 120                 125
Pro Glu Ile Leu Ser Ala Cys Ile Glu Gly Leu Arg Asp Phe Cys Arg
    130                 135                 140
Leu Arg Tyr Asn Pro Ser Gln Asp Glu Tyr Gly Asn Trp Trp Asp Trp
145                 150                 155                 160
Glu Asp Gly Ala Ser Arg Ala Val Ala Asp Val Met Cys Ile Leu His
                165                 170                 175
Asp Val Leu Pro Pro Glu Val Met Ser Ala Ala Ala Ala Gly Ile Asp
            180                 185                 190
His Phe Ile Pro Asp Pro Trp Phe Gln Gln Pro Ala Ser Val Lys Pro
        195                 200                 205
Thr Ala Asn Pro Val Gln Pro Val Val Ser Thr Gly Ala Asn Arg Met
    210                 215                 220
Asp Leu Thr Arg Ala Val Met Cys Arg Ser Ile Ala Thr Gly Asp Glu
225                 230                 235                 240
Lys Arg Leu Arg His Ala Val Asp Gly Leu Pro Asp Ala Trp Arg Val
                245                 250                 255
Thr Thr Glu Gly Asp Gly Phe Arg Ala Asp Gly Gly Phe Ile Gln His
            260                 265                 270
Ser His Ile Pro Tyr Thr Gly Gly Tyr Gly Asp Val Leu Phe Ser Gly
        275                 280                 285
Leu Ala Met Leu Phe Pro Leu Val Ser Gly Met Arg Phe Asp Ile Val
    290                 295                 300
Glu Ser Ala Arg Lys Ala Phe His Asp Gln Val Glu Arg Gly Phe Ile
305                 310                 315                 320
Pro Val Met Tyr Asn Gly Gln Ile Leu Asp Asp Val Arg Gly Arg Ser
                325                 330                 335
Ile Ser Arg Ile Asn Glu Ser Ala Ala Met His Gly Ile Ser Ile Ala
            340                 345                 350
Arg Ala Met Leu Met Met Ala Asp Ala Leu Pro Thr His Arg Ala Glu
        355                 360                 365
Gln Trp Arg Gly Ile Val His Gly Trp Met Ala Arg Asn Thr Phe Asp
    370                 375                 380
His Leu Ser Glu Pro Ser Thr Leu Val Asp Ile Ser Leu Phe Asp Ala
385                 390                 395                 400
Ala Ala Lys Ala Arg Pro Val Pro Glu Ser Ser Thr Pro Ser Tyr Phe
                405                 410                 415
Ala Ser Met Asp Arg Leu Val His Arg Thr Ala Asp Trp Leu Ile Thr
            420                 425                 430
Val Ser Asn Cys Ser Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Glu Tyr Gly Asn Gly
        435                 440                 445
Glu Asn Glu Trp Ala Ser Arg Thr Ser Gln Gly Met Arg Tyr Leu Leu
    450                 455                 460
Leu Pro Gly Asp Met Gly Gln Tyr Glu Asp Gly Tyr Trp Ala Thr Val
465                 470                 475                 480
Asp Tyr Ser Ala Pro Thr Gly Thr Thr Val Asp Ser Thr Pro Leu Lys
                485                 490                 495
Arg Ala Val Gly Ala Ser Trp Ala Ala Lys Thr Pro Thr Asn Glu Trp
            500                 505                 510
Ser Gly Gly Leu Ala Ser Gly Ser Trp Ser Ala Ala Ala Ser His Ile
        515                 520                 525
Thr Ser Gln Asp Ser Ala Leu Lys Ala Arg Arg Leu Trp Val Gly Leu
    530                 535                 540
Lys Asp Ala Met Val Glu Leu Thr Thr Asp Val Thr Thr Asp Ala Ser
545                 550                 555                 560
```

```
Arg Ala Ile Thr Val Val Glu His Arg Lys Val Ala Ser Ser Ser Thr
                565                 570                 575
Lys Leu Leu Val Asp Gly Asn Arg Val Ser Ser Ala Thr Ser Phe Gln
            580                 585                 590
Asn Pro Arg Trp Ala His Leu Asp Gly Val Gly Gly Tyr Val Phe Ala
        595                 600                 605
Thr Asp Thr Asp Leu Ser Ala Asp Val Ala Thr Arg Lys Gly Thr Trp
    610                 615                 620
Ile Asp Val Asn Pro Ser Arg Lys Val Lys Gly Ala Asp Glu Val Ile
625                 630                 635                 640
Glu Arg Ala Tyr Ala Ser Leu His Val Thr His His Asp Arg Pro Val
                645                 650                 655
Ala Trp Ala Leu Leu Pro Thr Ala Ser Arg Ser His Thr Met Ala Leu
            660                 665                 670
Ala Thr Arg Pro Gly Val Glu Pro Phe Thr Val Leu Arg Asn Asp Ala
        675                 680                 685
Thr Val Gln Ala Val Arg Ser Ala Gly Ala Leu Leu Thr Lys Asp Pro
    690                 695                 700
Thr Val Val Thr Thr Leu Ala Phe Trp Lys Pro Ala Thr Cys Gly Gly
705                 710                 715                 720
Val Ala Val Asn Arg Pro Ala Leu Val Gln Thr Arg Glu Ser Ala Asn
                725                 730                 735
Gln Met Glu Val Val Ile Val Glu Pro Thr Gln Lys Arg Gly Ser Leu
            740                 745                 750
Thr Val Thr Ile Glu Gly Ser Trp Lys Val Lys Thr Ala Asp Ser His
        755                 760                 765
Val Asp Val Ser Cys Glu Asn Ala Ala Gly Thr Leu His Val Asp Thr
    770                 775                 780
Ala Gly Leu Gly Gly Gln Ser Val Arg Val Thr Leu Ala Arg Gln Val
785                 790                 795                 800
Thr Gln Thr Pro Ser Gly Gly Gly Arg His Asp Arg Ala
                805                 810
```

<210> 225

<211> 1072

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 225

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

```
Ala Val Thr Gln Lys Val Asn Ile Asp Pro Thr Lys Lys Tyr Glu Val
                165                 170                 175
Lys Phe Asp Ile Glu Thr Ser Asn Lys Ala Gly Gln Ala Phe Leu Arg
            180                 185                 190
Ile Met Glu Lys Lys Asp Asn Asn Thr Arg Leu Trp Leu Ser Glu Met
        195                 200                 205
Thr Ser Gly Thr Thr Asn Lys His Thr Leu Thr Lys Ile Tyr Asn Pro
    210                 215                 220
Lys Leu Asn Val Ser Glu Val Thr Leu Glu Leu Tyr Tyr Glu Lys Gly
225                 230                 235                 240
Thr Gly Ser Ala Thr Phe Asp Asn Ile Ser Met Lys Ala Lys Gly Pro
                245                 250                 255
Lys Asp Ser Glu His Pro Gln Pro Val Thr Thr Gln Ile Glu Glu Ser
            260                 265                 270
Val Asn Thr Ala Leu Asn Lys Asn Tyr Val Phe Asn Lys Ala Asp Tyr
        275                 280                 285
Gln Tyr Thr Leu Thr Asn Pro Ser Leu Gly Lys Ile Val Gly Gly Ile
    290                 295                 300
Leu Tyr Pro Asn Ala Thr Gly Ser Thr Thr Val Lys Ile Ser Asp Lys
305                 310                 315                 320
Ser Gly Lys Ile Ile Lys Glu Val Pro Leu Ser Val Thr Ala Ser Thr
                325                 330                 335
Glu Asp Lys Phe Thr Lys Leu Leu Asp Lys Trp Asn Asp Val Thr Ile
            340                 345                 350
Gly Asn His Val Tyr Asp Thr Asn Asp Ser Asn Met Gln Lys Ile Asn
        355                 360                 365
Gln Lys Leu Asp Glu Thr Asn Ala Lys Asn Ile Lys Thr Ile Lys Leu
    370                 375                 380
Asp Ser Asn His Thr Phe Leu Trp Lys Asp Leu Asp Asn Leu Asn Asn
385                 390                 395                 400
Ser Ala Gln Leu Thr Ala Thr Tyr Arg Arg Leu Glu Asp Leu Ala Lys
                405                 410                 415
Gln Ile Thr Asn Pro His Ser Thr Ile Tyr Lys Asn Glu Lys Ala Ile
            420                 425                 430
Arg Thr Val Lys Glu Ser Leu Ala Trp Leu His Gln Asn Phe Tyr Asn
        435                 440                 445
Val Asn Lys Asp Ile Glu Gly Ser Ala Asn Trp Trp Asp Phe Glu Ile
    450                 455                 460
Gly Val Pro Arg Ser Ile Thr Ala Thr Leu Ala Leu Met Asn Asn Tyr
465                 470                 475                 480
Phe Thr Asp Ala Glu Ile Lys Thr Tyr Thr Asp Pro Ile Glu His Phe
                485                 490                 495
Val Pro Asp Ala Gly Tyr Phe Arg Lys Thr Leu Asp Asn Pro Phe Lys
            500                 505                 510
Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Met Gly Arg Val Lys Ile Ile Glu
        515                 520                 525
Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asn Thr Ile Ile Glu Lys Thr Ser His Ser
    530                 535                 540
Leu Lys Asn Leu Phe Thr Thr Ala Thr Lys Ala Glu Gly Phe Tyr Ala
545                 550                 555                 560
Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Thr Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr
                565                 570                 575
Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu Thr Gln Leu Leu Pro Ile Ile Gln
            580                 585                 590
Glu Thr Asp Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Glu Leu Asp Met Val Tyr Lys
        595                 600                 605
Trp Ile Asn Gln Ser Phe Leu Pro Leu Ile Val Lys Gly Glu Leu Met
    610                 615                 620
Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Glu Ala Ala Ser Ser His
625                 630                 635                 640
Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Phe Leu Arg Leu Ala Asn Met
                645                 650                 655
Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Asp Leu Lys Ser Thr Ile Lys Thr Ile
```

660 665 670
Ile Thr Ser Asn Lys Phe Tyr Asn Val Phe Asn Asn Leu Lys Ser Tyr
675 680 685
Ser Asp Ile Ala Asn Met Asn Lys Met Leu Asn Asp Ser Thr Val Ala
690 695 700
Thr Lys Pro Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr Phe Asn Ser Met Asp Arg
705 710 715 720
Leu Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Lys Asp Phe Gly Phe Ala Leu Ser Leu
725 730 735
His Ser Lys Arg Thr Leu Asn Tyr Glu Gly Met Asn Asp Glu Asn Thr
740 745 750
Arg Gly Trp Tyr Thr Gly Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp
755 760 765
Gln Ser His Tyr Ser Asn His Phe Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys
770 775 780
Met Ala Gly Thr Thr Glu Lys Asp Ala Lys Arg Glu Asp Thr Thr Lys
785 790 795 800
Glu Phe Met Ser Lys His Ser Lys Asp Ala Lys Glu Lys Thr Gly Gln
805 810 815
Val Thr Gly Thr Ser Asp Phe Val Gly Ser Val Lys Leu Asn Asp His
820 825 830
Phe Ala Leu Ala Ala Met Asp Phe Thr Asn Trp Asp Arg Thr Leu Thr
835 840 845
Ala Gln Lys Gly Trp Val Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly
850 855 860
Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn Gly Ile Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile
865 870 875 880
Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Tyr Thr Thr Tyr Val Asn
885 890 895
Gly Lys Thr Ile Asp Leu Lys Gln Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp
900 905 910
Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu Ser Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly
915 920 925
Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser Thr Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln
930 935 940
Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile Asn Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile
945 950 955 960
Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr Ile Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly
965 970 975
Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met Val Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe
980 985 990
Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys Glu Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser
995 1000 1005
Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp Lys Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile
1010 1015 1020
Lys His Asp Asn Gln Glu Ser Leu Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn
1025 1030 1035 1040
Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val Gln Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn
1045 1050 1055
Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr Met Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile
1060 1065 1070

<210> 226

<211> 1072

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae 18RS21

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 226

Met Glu Ile Lys Lys Lys His Arg Ile Met Leu Tyr Ser Ala Leu Ile

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

```
Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Met Gly Arg Val Lys Ile Ile Glu
        515                 520                 525
Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asn Thr Ile Ile Glu Lys Thr Ser His Ser
    530                 535                 540
Leu Lys Asn Leu Phe Thr Thr Ala Thr Lys Ala Glu Gly Phe Tyr Ala
545                 550                 555                 560
Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Thr Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr
                565                 570                 575
Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu Thr Gln Leu Leu Pro Ile Ile Gln
            580                 585                 590
Glu Thr Asp Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Glu Leu Asp Met Val Tyr Lys
        595                 600                 605
Trp Ile Asn Gln Ser Phe Leu Pro Leu Ile Val Lys Gly Glu Leu Met
    610                 615                 620
Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Glu Ala Ala Ser Ser His
625                 630                 635                 640
Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Phe Leu Arg Leu Ala Asn Met
                645                 650                 655
Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Asp Leu Ile Ser Thr Ile Lys Thr Ile
            660                 665                 670
Ile Thr Ser Asn Lys Phe Tyr Asn Val Phe Asn Asn Leu Lys Ser Tyr
        675                 680                 685
Ser Asp Ile Ala Asn Met Asn Lys Met Leu Asn Asp Ser Thr Val Ala
    690                 695                 700
Thr Lys Pro Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr Phe Asn Ser Met Asp Arg
705                 710                 715                 720
Leu Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Lys Asp Phe Gly Phe Ala Leu Ser Leu
                725                 730                 735
His Ser Lys Arg Thr Leu Asn Tyr Glu Gly Met Asn Asp Glu Asn Thr
            740                 745                 750
Arg Gly Trp Tyr Thr Gly Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp
        755                 760                 765
Gln Ser His Tyr Ser Asn His Phe Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys
    770                 775                 780
Met Ala Gly Thr Thr Glu Lys Asp Ala Lys Arg Glu Asp Thr Thr Lys
785                 790                 795                 800
Glu Phe Met Ser Lys His Ser Lys Asp Ala Lys Glu Lys Thr Gly Gln
                805                 810                 815
Val Thr Gly Thr Ser Asp Phe Val Gly Ser Val Lys Leu Asn Asp His
            820                 825                 830
Phe Ala Leu Ala Ala Met Asp Phe Thr Asn Trp Asp Arg Thr Leu Thr
        835                 840                 845
Ala Gln Lys Gly Trp Val Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly
    850                 855                 860
Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn Gly Ile Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile
865                 870                 875                 880
Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Tyr Thr Thr Tyr Val Asn
                885                 890                 895
Gly Lys Thr Ile Asp Leu Lys Gln Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp
            900                 905                 910
Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu Ser Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly
        915                 920                 925
Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser Thr Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln
    930                 935                 940
Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile Asn Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile
945                 950                 955                 960
Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr Ile Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly
                965                 970                 975
Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met Val Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe
            980                 985                 990
Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys Glu Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser
        995                 1000                1005
Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp Lys Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile

    1010                1015                1020
Lys His Asp Asn Gln Glu Ser Leu Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn
1025                1030                1035                1040
Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val Gln Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn
                1045                1050                1055
Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr Met Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile
            1060                1065                1070
```

<210> 227

<211> 1081

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae serotip Ia

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 227

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

```
        355                 360                 365
Asn Met Gln Lys Leu Asn Gln Lys Leu Asp Glu Thr Asn Ala Lys Asn
    370                 375                 380
Ile Lys Asp Ile Lys Leu Asp Ser Asn Arg Thr Phe Leu Trp Glu Asp
385                 390                 395                 400
Leu Lys Gly Leu Asn Asn Ser Ala Gln Leu Thr Ala Thr Tyr Arg Arg
                405                 410                 415
Leu Glu Asp Leu Ala Lys Gln Ile Thr Asn Pro His Ser Thr Ile Tyr
            420                 425                 430
Lys Asn Glu Lys Ala Ile Arg Thr Val Lys Glu Ser Leu Ala Trp Leu
        435                 440                 445
His Gln Asn Phe Tyr Asn Val Asn Lys Asp Ile Glu Gly Ser Ala Asn
    450                 455                 460
Trp Trp Asp Phe Glu Ile Gly Val Pro Arg Ser Ile Thr Ala Thr Leu
465                 470                 475                 480
Ala Leu Met Asn Asn Tyr Phe Thr Asp Ala Glu Ile Lys Thr Tyr Thr
                485                 490                 495
Asp Pro Ile Glu His Phe Val Pro Asp Ala Gly Tyr Phe Arg Lys Thr
            500                 505                 510
Leu Val Asn Pro Phe Lys Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Met Gly
        515                 520                 525
Arg Val Lys Ile Ile Glu Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asn Thr Ile Ile
    530                 535                 540
Lys Lys Thr Ser His Ser Leu Lys Asn Leu Phe Thr Thr Ala Thr Lys
545                 550                 555                 560
Ala Glu Gly Phe Tyr Ala Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Thr Asn Val
                565                 570                 575
Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu Thr Gln
            580                 585                 590
Leu Leu Pro Ile Ile Gln Glu Thr Asp Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Glu
        595                 600                 605
Leu Asp Met Val Tyr Lys Trp Ile Asn Gln Ser Phe Leu Pro Leu Ile
    610                 615                 620
Val Lys Gly Glu Leu Met Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg
625                 630                 635                 640
Glu Ala Ala Ser Ser His Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Phe
                645                 650                 655
Leu Arg Leu Ala Asn Met Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Asp Leu Lys
            660                 665                 670
Ser Thr Ile Lys Thr Ile Ile Thr Ser Asn Lys Phe Tyr Asn Val Phe
        675                 680                 685
Asn Asn Leu Lys Ser Tyr Ser Asp Ile Ala Asn Met Asn Lys Leu Leu
    690                 695                 700
Asn Asp Ser Thr Val Ala Thr Lys Pro Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr
705                 710                 715                 720
Phe Asn Ser Met Asp Arg Leu Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Lys Asp Phe
                725                 730                 735
Gly Phe Ala Leu Ser Leu His Ser Lys Arg Thr Leu Asn Tyr Glu Gly
            740                 745                 750
Met Asn Asp Glu Asn Thr Arg Gly Trp Tyr Thr Gly Asp Gly Met Phe
        755                 760                 765
Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp Gln Ser His Tyr Ser Asn His Phe Trp Pro
    770                 775                 780
Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Ala Gly Thr Thr Glu Lys Asp Thr Gly
785                 790                 795                 800
Arg Glu Asp Thr Ile Lys Lys Leu Met Asn Arg Tyr Asp Lys Thr Asn
                805                 810                 815
Lys Asn Ser Lys Val Met Thr Gly Gln Val Thr Gly Thr Ser Asp Phe
            820                 825                 830
Val Gly Ser Val Lys Leu Asn Asp His Phe Ala Leu Ala Ala Met Asp
        835                 840                 845
Phe Thr Asn Trp Asp Arg Thr Leu Thr Ala Gln Lys Gly Trp Val Ile
    850                 855                 860
```

```
Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn
865                 870                 875                 880
Gly Val Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser
                885                 890                 895
Lys Thr Pro Tyr Thr Thr Tyr Val Asn Gly Lys Thr Val Asp Leu Lys
            900                 905                 910
Gln Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu
        915                 920                 925
Ser Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser
    930                 935                 940
Thr Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile
945                 950                 955                 960
Asn Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr
                965                 970                 975
Ile Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met
            980                 985                 990
Val Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys
        995                 1000                1005
Glu Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp
    1010                1015                1020
Lys Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile Lys His Asp Asn Gln Glu Ser
1025                1030                1035                1040
Leu Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val
                1045                1050                1055
Gln Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr
            1060                1065                1070
Met Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile
        1075                1080
```

<210> 228

<211> 984

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae serotip III

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 228

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

```
Tyr Val Phe Asn Lys Ala Asp Tyr Gln Tyr Thr Leu Thr Asn Pro Ser
        195                 200                 205
Leu Gly Lys Ile Val Gly Gly Ile Leu Tyr Pro Asn Ala Thr Gly Ser
    210                 215                 220
Thr Thr Val Lys Ile Ser Asp Lys Ser Gly Lys Ile Ile Lys Glu Val
225                 230                 235                 240
Pro Leu Ser Val Thr Ala Ser Thr Glu Asp Lys Phe Thr Lys Leu Leu
                245                 250                 255
Asp Lys Trp Asn Asp Val Thr Ile Gly Asn His Val Tyr Asp Thr Asn
            260                 265                 270
Asp Ser Asn Met Gln Lys Ile Asn Gln Lys Leu Asp Glu Thr Asn Ala
        275                 280                 285
Lys Asn Ile Lys Thr Ile Lys Leu Asp Ser Asn His Thr Phe Leu Trp
    290                 295                 300
Lys Asp Leu Asp Asn Leu Asn Asn Ser Ala Gln Leu Thr Ala Thr Tyr
305                 310                 315                 320
Arg Arg Leu Glu Asp Leu Ala Lys Gln Ile Thr Asn Pro His Ser Thr
                325                 330                 335
Ile Tyr Lys Asn Glu Lys Ala Ile Arg Thr Val Lys Glu Ser Leu Ala
            340                 345                 350
Trp Leu His Gln Asn Phe Tyr Asn Val Asn Lys Asp Ile Glu Gly Ser
        355                 360                 365
Ala Asn Trp Trp Asp Phe Glu Ile Gly Val Pro Arg Ser Ile Thr Ala
    370                 375                 380
Thr Leu Ala Leu Met Asn Asn Tyr Phe Thr Asp Ala Glu Ile Lys Thr
385                 390                 395                 400
Tyr Thr Asp Pro Ile Glu His Phe Val Pro Asp Ala Gly Tyr Phe Arg
                405                 410                 415
Lys Thr Leu Asp Asn Pro Phe Lys Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp
            420                 425                 430
Met Gly Arg Val Lys Ile Ile Glu Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asn Thr
        435                 440                 445
Ile Ile Glu Lys Thr Ser His Ser Leu Lys Asn Leu Phe Thr Thr Ala
    450                 455                 460
Thr Lys Ala Glu Gly Phe Tyr Ala Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Thr
465                 470                 475                 480
Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu
                485                 490                 495
Thr Gln Leu Leu Pro Ile Ile Gln Glu Thr Asp Tyr Lys Ile Ser Asn
            500                 505                 510
Gln Glu Leu Asp Met Val Tyr Lys Trp Ile Asn Gln Ser Phe Leu Pro
        515                 520                 525
Leu Ile Val Lys Gly Glu Leu Met Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser Ile
    530                 535                 540
Ser Arg Glu Ala Ala Ser Ser His Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Arg
545                 550                 555                 560
Gly Phe Leu Arg Leu Ala Asn Met Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Asp
                565                 570                 575
Leu Lys Ser Thr Ile Lys Thr Ile Ile Thr Ser Asn Lys Phe Tyr Asn
            580                 585                 590
Val Phe Asn Asn Leu Lys Ser Tyr Ser Asp Ile Ala Asn Met Asn Lys
        595                 600                 605
Met Leu Asn Asp Ser Thr Val Ala Thr Lys Pro Leu Lys Ser Asn Leu
    610                 615                 620
Ser Thr Phe Asn Ser Met Asp Arg Leu Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Lys
625                 630                 635                 640
Asp Phe Gly Phe Ala Leu Ser Leu His Ser Lys Arg Thr Leu Asn Tyr
                645                 650                 655
Glu Gly Met Asn Asp Glu Asn Thr Arg Asp Trp Tyr Thr Gly Asp Gly
            660                 665                 670
Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp Gln Ser His Tyr Ser Asn His Phe
        675                 680                 685
Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Ala Gly Thr Thr Glu Lys Asp
```

```
    690                 695                 700
Ala Lys Arg Glu Asp Thr Thr Lys Glu Phe Met Ser Lys His Ser Lys
705                 710                 715                 720
Asp Ala Lys Glu Lys Thr Gly Gln Val Thr Gly Thr Ser Asp Phe Val
                725                 730                 735
Gly Ser Val Lys Leu Asn Asp His Phe Ala Leu Ala Ala Met Asp Phe
            740                 745                 750
Thr Asn Trp Asp Arg Thr Leu Thr Ala Gln Lys Gly Trp Val Ile Leu
        755                 760                 765
Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn Gly
    770                 775                 780
Ile Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser Lys
785                 790                 795                 800
Thr Pro Tyr Thr Thr Thr Tyr Val Asn Gly Lys Thr Ile Asp Leu Lys Gln
                805                 810                 815
Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu Ser
            820                 825                 830
Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser Thr
        835                 840                 845
Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile Asn
    850                 855                 860
Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr Ile
865                 870                 875                 880
Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met Val
                885                 890                 895
Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys Glu
            900                 905                 910
Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp Lys
        915                 920                 925
Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile Lys His Asp Asn Gln Glu Ser Leu
    930                 935                 940
Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val Gln
945                 950                 955                 960
Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr Met
                965                 970                 975
Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile
            980
```

<210> 229

<211> 807

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (suş COL)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 229

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

```
        115                 120                 125
Arg Asn Pro Lys Thr Thr Leu Asn Thr Asp Glu Asn Lys Lys Lys Val
    130                 135                 140
Lys Asp Ala Leu Glu Trp Leu His Lys Asn Ala Tyr Gly Lys Glu Pro
145                 150                 155                 160
Asp Lys Lys Val Lys Glu Leu Ser Glu Asn Phe Thr Lys Thr Thr Gly
                165                 170                 175
Lys Asn Thr Asn 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> 230

<211> 420

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (suş MRSA252)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 230

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

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

<210> 231

<211> 806

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (suş MRSA252)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 231

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

```
Asp Glu Met Lys Asn Tyr Ser Lys Pro Ile Ser Thr Tyr Ala Pro Ser
    210                 215                 220
Ser Asp Lys Ile Leu Ser Ser Val Gly Glu Ser Glu Asp Ala Lys Gly
225                 230                 235                 240
Gly Asn Leu Val Asp Ile Ser Lys Val Lys Leu Leu Glu Ser Val Ile
                245                 250                 255
Glu Glu Asp Val Asp Met Leu Lys Lys Ser Ile Asp Ser Phe Asn Lys
            260                 265                 270
Val Phe Thr Tyr Val Gln Asp Ser Ala Thr Gly Lys Gly Arg Asn Gly
        275                 280                 285
Phe Tyr Lys Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Gln Asp Val Pro Tyr Thr
    290                 295                 300
Gly Ala Tyr Gly Val Val Leu Leu Glu Gly Ile Ser Glu Met Met Pro
305                 310                 315                 320
Met Ile Lys Glu Ser Pro Phe Lys Thr Thr Gln Asp Asn Ala Thr Leu
                325                 330                 335
Ser Asn Trp Ile Asp Glu Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Glu
            340                 345                 350
Met Met Asp Leu Ser Arg Gly Arg Ala Ile Ser Arg Glu Asn Glu Thr
        355                 360                 365
Ser His Thr Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu Asn
    370                 375                 380
Asp Thr Met Asp Asp Ser Thr Lys Thr Arg Tyr Lys Gln Ile Val Lys
385                 390                 395                 400
Thr Ser Val Asn Ser Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Asn
                405                 410                 415
Ser Tyr Ser Asp Ile Ala Lys Met Lys Lys Leu Met Asn Asp Ser Thr
            420                 425                 430
Ile Ser Lys Asn Asp Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met
        435                 440                 445
Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu
    450                 455                 460
Ser Met Thr Ser Lys Asn Ile Ala Arg Tyr Glu Asn Ile Asn Gly Glu
465                 470                 475                 480
Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn
                485                 490                 495
Ser Asp Val Lys His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala Thr Ala Asp Met
            500                 505                 510
Thr Cys Leu Pro Gly Thr Thr Thr Leu Asn Asp Met Pro Ser Thr Asn
        515                 520                 525
Thr Lys Asn Asp Lys Ser Phe Val Gly Gly Thr Lys Leu Asn Asn Lys
    530                 535                 540
Tyr Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys Thr Leu Thr
545                 550                 555                 560
Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly
                565                 570                 575
Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val Thr Ser Val
            580                 585                 590
Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Lys Leu Phe Lys Asp Asp Ile Glu
        595                 600                 605
Ile Thr Thr Ser Asp Val Asn Ala Gln Glu Thr His Ser Val Phe Leu
    610                 615                 620
Glu Ser Asn Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asp Lys
625                 630                 635                 640
Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Ser Glu
                645                 650                 655
Ile Asn Lys Ser Gln Lys Lys Asp Asp Lys Lys Asp Glu Tyr Tyr Glu
            660                 665                 670
Val Thr Gln Thr His Asn Thr Ser Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Val Leu
        675                 680                 685
Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Ser Asp Phe Lys Ser Lys Asn Asn Asn Val
    690                 695                 700
Ser Ile Val Lys Gln Asp Glu Asp Phe His Val Ile Lys Asp Asn Asp
```

```
705                 710                 715                 720
Gly Val Phe Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asp Asn Thr Lys Ser Phe Asp
                725                 730                 735
Ile Asn Gly Ile Thr Val Glu Leu Lys Glu Lys Gly Met Phe Val Ile
            740                 745                 750
Lys Lys Lys Asp Asp Lys Ala Tyr Lys Cys Ser Phe Tyr Asn Pro Glu
        755                 760                 765
Thr Thr Asn Thr Ala Ser Asn Ile Glu Ser Lys Ile Phe Ile Lys Gly
    770                 775                 780
Tyr Thr Ile Thr Asn Lys Ser Val Ile Asn Ser Asn Asp Ala Gly Val
785                 790                 795                 800
Asn Phe Glu Leu Thr Lys
                805
```

<210> 232

<211> 815

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (suş MSSA476)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 232

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

```
305                 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 Thr Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ser
    370                 375                 380
Asp Ala Met Asp Asp Ser Thr Lys Ala Lys Tyr Lys Gln Ile Val Lys
385                 390                 395                 400
Thr Ser Val Lys Ser Asp Ser Ser Tyr Gly Gln Asn Asp Thr Leu Ser
                405                 410                 415
Ser Tyr Ser Asp Ile Ser Lys Met Lys Ser Leu Met Glu Asp Ser Thr
            420                 425                 430
Ile Ser Thr Asn Gly Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met
        435                 440                 445
Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu
    450                 455                 460
Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu
465                 470                 475                 480
Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn
                485                 490                 495
Ser Asp Val Lys His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala Thr Ala Asp Met
            500                 505                 510
Lys Arg Leu Ala Gly Thr Thr Thr Leu Glu Asn Glu Glu Pro Lys Gly
        515                 520                 525
Thr Asp Val Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Phe
    530                 535                 540
Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys
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 Ala Ser Asp Asn Gln Gly Thr Asn Ser Val Phe
    610                 615                 620
Leu Glu Ser Thr Asn Lys Pro Lys Asn Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu
625                 630                 635                 640
Asn Glu Ser Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp
                645                 650                 655
Ser Asp Ile Asn Lys Ser Gln Lys Gln Asp Ser Lys Thr Asn Gln Tyr
            660                 665                 670
Tyr Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Thr Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr
        675                 680                 685
Val Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Asp Phe Asn Thr Lys Lys Asp
    690                 695                 700
Lys Val Thr Val Val Lys Gln Asp Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp
705                 710                 715                 720
Asn Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asp Ser Thr Gln Thr
                725                 730                 735
Phe Ile Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met Phe
            740                 745                 750
Ile Leu Lys Lys Lys Asp Asp Lys Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn
        755                 760                 765
Pro Glu Ser Thr Asn Thr Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser Met
    770                 775                 780
Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Thr Ser Asn Glu Ser
785                 790                 795                 800
Gly Val Arg Phe Glu Leu Gln Gln Thr Leu Asn Lys Asp Asp Asn
                805                 810                 815
```

<210> 233

<211> 807

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (suş NCTC 8325)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 233

```
Met Thr Tyr Arg Ile Lys Lys Trp Gln Lys Leu Ser Thr Ile Thr Leu
 1               5                  10                  15
Leu Met Ala Gly Val Ile Thr Leu Asn Gly Gly Glu Phe Arg Ser Val
            20                  25                  30
Asp Lys His Gln Ile Ala Val Ala Asp Thr Asn Val Gln Thr Pro Asp
        35                  40                  45
Tyr Glu Lys Leu Arg Asn Thr Trp Leu Asp Val Asn Tyr Gly Tyr Asp
    50                  55                  60
Lys Tyr Asp Glu Asn Asn Pro Asp Met Lys Lys Lys Phe Asp Ala Thr
65                  70                  75                  80
Glu Lys Glu Ala Thr Asn Leu Leu Lys Glu Met Lys Thr Glu Ser Gly
                85                  90                  95
Arg Lys Tyr Leu Trp Ser Gly Ala Glu Thr Leu Glu Thr Asn Ser Ser
            100                 105                 110
His Met Thr Arg Thr Tyr Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ala Glu Ala Met
        115                 120                 125
Arg Asn Pro Lys Thr Thr Leu Asn Thr Asp Glu Asn Lys Lys Lys Val
    130                 135                 140
Lys Asp Ala Leu Glu Trp Leu His Lys Asn Ala Tyr Gly Lys Glu Pro
145                 150                 155                 160
Asp Lys Lys Val Lys Glu Leu Ser Glu Asn Phe Thr Lys Thr Thr Gly
                165                 170                 175
Lys Asn Thr Asn Leu Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Lys
            180                 185                 190
Ser Leu Thr Asn Thr Leu Ile Leu Leu Asn Asp Gln Phe Ser Asn Glu
        195                 200                 205
Glu Lys Lys Lys Phe Thr Ala Pro Ile Lys Thr Phe Ala Pro Asp Ser
    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> 234

<211> 809

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (suş büyükbaş hayvan RF122)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 234

```
Met Thr Tyr Arg Met Lys Lys Trp Gln Lys Leu Ser Thr Ile Thr Leu
 1               5                  10                  15
```

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

```
        515                 520                 525
Gly Thr Asp Val Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys
    530                 535                 540
Phe Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp
545                 550                 555                 560
Lys Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile
                565                 570                 575
Val Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Thr Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro
            580                 585                 590
Val Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala His Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr
        595                 600                 605
Asp Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asn Asn Gln Glu Thr Asn Ser Val
    610                 615                 620
Phe Leu Glu Ser Thr Asn Ser Thr Gln Asn Asn Ile Gly Tyr His Phe
625                 630                 635                 640
Leu Asn Lys Ser Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys
                645                 650                 655
Trp Ser Asp Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu
            660                 665                 670
Tyr Tyr Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Thr Asp Asp Lys Tyr Ala
        675                 680                 685
Tyr Val Leu Tyr Pro Gly Ile Thr Lys Asp Asn Phe Lys Ser Lys Ala
    690                 695                 700
Ser Gln Val Thr Val Val Lys Gln Asp Asp Asp Phe His Val Val Lys
705                 710                 715                 720
Asp Asn Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asp Ser Thr Gln
                725                 730                 735
Thr Phe Asp Ile Asn Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met
            740                 745                 750
Phe Ile Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr
        755                 760                 765
Asn Pro Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser
    770                 775                 780
Met Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Asn Thr Asn Glu
785                 790                 795                 800
Ser Gly Val Arg Phe Glu Leu Thr Lys
                805
```

<210> 235

<211> 807

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (suş büyükbaş hayvan RF122)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 235

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

```
        115                 120                 125
Arg His Lys Asn Thr Ser Leu Lys Thr Asp Glu Asn Lys Leu Lys Ile
    130                 135                 140
Lys Asp Ala Ile Lys Trp Leu His His Asn Val Tyr Gly Lys Asp Pro
145                 150                 155                 160
Asp Lys Lys Val Ala Asp Leu Thr Thr Asn Arg Lys Glu Lys Asp Ser
                165                 170                 175
Ser Lys Lys Asn Asn Ser Leu Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr
            180                 185                 190
Pro Arg Ala Leu Thr Asn Thr Leu Leu Leu Met Asp Asn Met Leu Thr
        195                 200                 205
Lys Asp Glu Met Lys Asn Tyr Ser Lys Pro Ile Ser Ile Tyr Ser Pro
    210                 215                 220
Ser Ser Tyr Lys Ile Leu Ser Ser Val Gly Glu Ser Glu Asp Ala Lys
225                 230                 235                 240
Gly Gly Asn Leu Val Asp Ile Ala Lys Val Lys Phe Leu Glu Ser Val
                245                 250                 255
Ile Glu Glu Asp Val Asp Met Met Lys Lys Ser Ile Asp Ser Phe Asn
            260                 265                 270
Lys Val Phe Thr Tyr Val Gln Asp Ser Ala Thr Gly Lys Ala Arg Asn
        275                 280                 285
Gly Phe Tyr Lys Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Gln Asp Val Pro Tyr
    290                 295                 300
Thr Gly Ala Tyr Gly Val Val Leu Leu Glu Gly Ile Ser Gln Met Met
305                 310                 315                 320
Pro Met Ile Lys Glu Ser Pro Phe Lys His Thr Gln Asp Lys Ala Thr
                325                 330                 335
Leu Ser Asn Trp Ile Asp Glu Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly
            340                 345                 350
Glu Met Met Asp Leu Ser Arg Gly Arg Ala Ile Ser Arg Glu Asn Glu
        355                 360                 365
Thr Ser His Thr Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu
    370                 375                 380
Ser Asp Thr Met Asp Glu Ser Thr Lys Thr Lys Tyr Lys Gln Ile Val
385                 390                 395                 400
Lys Thr Ser Val Lys Ser Asp Ser Ser Tyr Asp Ser Asn Asp Thr Leu
                405                 410                 415
Asn Ser Tyr Ser Asp Ile Asp Lys Met Lys Lys Leu Met Asn Asp Ser
            420                 425                 430
Thr Ile Ser Lys Asn Asp Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp
        435                 440                 445
Met Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Glu Leu Asp Phe Ala Phe Gly
    450                 455                 460
Leu Ser Met Thr Ser Lys Asn Ile Ala Arg Tyr Glu Asn Ile Asn Gly
465                 470                 475                 480
Glu Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr
                485                 490                 495
Asn Ser Asp Val Lys His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala Thr Ala Asp
            500                 505                 510
Met Thr Arg Leu Pro Gly Thr Thr Thr Leu Asn Asp Met Pro Ser Thr
        515                 520                 525
Asn Thr Lys Asn Asp Lys Ser Phe Val Gly Gly Thr Lys Leu Asn Asn
    530                 535                 540
Lys Tyr Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys Thr Leu
545                 550                 555                 560
Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Ile
                565                 570                 575
Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val Thr Ser
            580                 585                 590
Val Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Lys Leu Phe Lys Gly Asp Ile
        595                 600                 605
Glu Ile Thr Thr Ser Asp Val Asn Ala Gln Glu Thr His Ser Val Phe
    610                 615                 620
```

```
Leu Glu Ser Asn Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asp
625                 630                 635                 640
Lys Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Ser
                645                 650                 655
Glu Ile Asn Lys Ser Gln Lys Thr Asp Asp Lys Lys Asp Glu Tyr Tyr
            660                 665                 670
Glu Val Thr Gln Thr His Asn Thr Ser Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Val
        675                 680                 685
Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Ser Asp Phe Lys Ser Lys Asn Asn Asn
    690                 695                 700
Val Ser Ile Val Lys Gln Asp Glu Asp Phe His Val Ile Lys Asp Asn
705                 710                 715                 720
Asp Gly Val Phe Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asp Ser Thr Lys Ser Phe
                725                 730                 735
Asp Ile Asn Gly Thr Ile Val Glu Leu Lys Glu Lys Gly Met Phe Val
            740                 745                 750
Ile Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn Pro
        755                 760                 765
Thr Ser Thr Asn Ser Thr Ser Asn Lys Glu Ser Lys Ile Ser Val Thr
    770                 775                 780
Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Gln Ser Val Ser Asn Phe Lys Glu Ser Asp
785                 790                 795                 800
Ile His Phe Glu Leu Thr Lys
                805
```

<210> 236

<211> 807

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (suş USA300)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 236

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

```
Asp Lys Ile Leu Ser Ser Val Gly Lys Ala Glu Leu Ala Lys Gly Gly
225                 230                 235                 240
Asn Leu Val Asp Ile Ser Lys Val Lys Leu Leu Glu Cys Ile Ile Glu
                245                 250                 255
Glu Asp Lys Asp Met Met Lys Lys Ser Ile Asp Ser Phe Asn Lys Val
            260                 265                 270
Phe Thr Tyr Val Gln Asp Ser Ala Thr Gly Lys Glu Arg Asn Gly Phe
        275                 280                 285
Tyr Lys Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Gln Asp Val Pro Tyr Thr Gly
    290                 295                 300
Ala Tyr Gly Val Val Leu Leu Glu Gly Ile Ser Gln Met Met Pro Met
305                 310                 315                 320
Ile Lys Glu Thr Pro Phe Asn Asp Lys Thr Gln Asn Asp Thr Thr Leu
                325                 330                 335
Lys Ser Trp Ile Asp Asp Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Glu
            340                 345                 350
Met Met Asp Leu Ser Arg Gly Arg Ala Ile Ser Arg Glu Asn Glu Thr
        355                 360                 365
Ser His Ser Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ser
    370                 375                 380
Asp Ala Met Asp Asp Ser Thr Lys Ala Lys Tyr Lys Lys Ile Val Lys
385                 390                 395                 400
Ser Ser Val Glu Ser Asp Ser Ser Tyr Lys Gln Asn Asp Tyr Leu Asn
                405                 410                 415
Ser Tyr Ser Asp Ile Asp Lys Met Lys Ser Leu Met Thr Asp Asn Ser
            420                 425                 430
Ile Ser Lys Asn Gly Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met
        435                 440                 445
Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu
    450                 455                 460
Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu
465                 470                 475                 480
Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn
                485                 490                 495
Ser Asp Val Lys His Tyr His Asp Asn Phe Trp Val Thr Ala Asp Met
            500                 505                 510
Lys Arg Leu Ser Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu Ile Leu Lys Asp
        515                 520                 525
Thr Asp Asp Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Val
    530                 535                 540
Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys
545                 550                 555                 560
Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val
                565                 570                 575
Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val
            580                 585                 590
Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr Asp
        595                 600                 605
Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asp Asn Gln Glu Asn Asn Ser Val Phe
    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> 237

<211> 1066

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 237

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

```
                    325                 330                 335
Ala Asp Arg Thr Tyr Leu Trp Glu Lys Phe Ser Asn Tyr Lys Thr Ser
            340                 345                 350
Ala Asn Leu Thr Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Glu Glu Met Ala Lys Gln
        355                 360                 365
Val Thr Asn Pro Ser Ser Arg Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Val Val Arg
    370                 375                 380
Thr Val Arg Asp Ser Met Glu Trp Met His Lys His Val Tyr Asn Ser
385                 390                 395                 400
Glu Lys Ser Ile Val Gly Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro
                405                 410                 415
Arg Ala Ile Asn Asn Thr Leu Ser Leu Met Lys Glu Tyr Phe Ser Asp
            420                 425                 430
Glu Glu Ile Lys Lys Tyr Thr Asp Val Ile Glu Lys Phe Val Pro Asp
        435                 440                 445
Pro Glu His Phe Arg Lys Thr Thr Asp Asn Pro Phe Lys Ala Leu Gly
    450                 455                 460
Gly Asn Leu Val Asp Met Gly Arg Val Lys Val Ile Ala Gly Leu Leu
465                 470                 475                 480
Arg Lys Asp Asp Gln Glu Ile Ser Ser Thr Ile Arg Ser Ile Glu Gln
                485                 490                 495
Val Phe Lys Leu Val Asp Gln Gly Glu Gly Phe Tyr Gln Asp Gly Ser
            500                 505                 510
Tyr Ile Asp His Thr Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val
        515                 520                 525
Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Leu Pro Val Ile Gln Lys Thr Lys
    530                 535                 540
Asn Pro Ile Asp Lys Asp Lys Met Gln Thr Met Tyr His Trp Ile Asp
545                 550                 555                 560
Lys Ser Phe Ala Pro Leu Leu Val Asn Gly Glu Leu Met Asp Met Ser
                565                 570                 575
Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Ala Asn Ser Glu Gly His Val Ala Ala
            580                 585                 590
Val Glu Val Leu Arg Gly Ile His Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu Gly
        595                 600                 605
Glu Thr Lys Gln Cys Leu Gln Ser Leu Val Lys Thr Ile Val Gln Ser
    610                 615                 620
Asp Ser Tyr Tyr Asp Val Phe Lys Asn Leu Lys Thr Tyr Lys Asp Ile
625                 630                 635                 640
Ser Leu Met Gln Ser Leu Leu Ser Asp Ala Gly Val Ala Ser Val Pro
                645                 650                 655
Arg Pro Ser Tyr Leu Ser Ala Phe Asn Lys Met Asp Lys Thr Ala Met
            660                 665                 670
Tyr Asn Ala Glu Lys Gly Phe Gly Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser Ser
        675                 680                 685
Arg Thr Leu Asn Tyr Glu His Met Asn Lys Glu Asn Lys Arg Gly Trp
    690                 695                 700
Tyr Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Gly Asp Leu Ser His
705                 710                 715                 720
Tyr Ser Asp Gly Tyr Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Pro Gly
                725                 730                 735
Thr Thr Glu Thr Asp Ala Lys Arg Ala Asp Ser Asp Thr Gly Lys Val
            740                 745                 750
Leu Pro Ser Ala Phe Val Gly Thr Ser Lys Leu Asp Asp Ala Asn Ala
        755                 760                 765
Thr Ala Thr Met Asp Phe Thr Asn Trp Asn Gln Thr Leu Thr Ala His
    770                 775                 780
Lys Ser Trp Phe Met Leu Lys Asp Lys Ile Ala Phe Leu Gly Ser Asn
785                 790                 795                 800
Ile Gln Asn Thr Ser Thr Asp Thr Ala Ala Thr Thr Ile Asp Gln Arg
                805                 810                 815
Lys Leu Glu Ser Gly Asn Pro Tyr Lys Val Tyr Val Asn Asp Lys Glu
            820                 825                 830
```

```
Ala Ser Leu Thr Glu Gln Glu Lys Asp Tyr Pro Glu Thr Gln Ser Val
        835                 840                 845
Phe Leu Glu Ser Phe Asp Ser Lys Lys Asn Ile Gly Tyr Phe Phe Phe
    850                 855                 860
Lys Lys Ser Ser Ile Ser Met Ser Lys Ala Leu Gln Lys Gly Ala Trp
865                 870                 875                 880
Lys Asp Ile Asn Glu Gly Gln Ser Asp Lys Glu Val Glu Asn Glu Phe
                885                 890                 895
Leu Thr Ile Ser Gln Ala His Lys Gln Asn Arg Asp Ser Tyr Gly Tyr
            900                 905                 910
Met Leu Ile Pro Asn Val Asp Arg Ala Thr Phe Asn Gln Met Ile Lys
        915                 920                 925
Glu Leu Glu Ser Ser Leu Ile Glu Asn Asn Glu Thr Leu Gln Ser Val
    930                 935                 940
Tyr Asp Ala Lys Gln Gly Val Trp Gly Ile Val Lys Tyr Asp Asp Ser
945                 950                 955                 960
Val Ser Thr Ile Ser Asn Gln Phe Gln Val Leu Lys Arg Gly Val Tyr
                965                 970                 975
Thr Ile Arg Lys Glu Gly Asp Glu Tyr Lys Ile Ala Tyr Tyr Asn Pro
            980                 985                 990
Glu Thr Gln Glu Ser Ala Pro Asp Gln Glu Val Phe Lys Lys Leu Glu
        995                 1000                1005
Gln Ala Ala Gln Pro Gln Val Gln Asn Ser Lys Glu Lys Glu Lys Ser
    1010                1015                1020
Glu Glu Glu Lys Asn His Ser Asp Gln Lys Asn Leu Pro Gln Thr Gly
1025                1030                1035                1040
Glu Gly Gln Ser Ile Leu Ala Ser Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly Ala
                1045                1050                1055
Phe Tyr Leu Phe Arg Arg Gly Lys Asn Asn
            1060                1065
```

<210> 238

<211> 1078

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae (suş ATCC BAA-255/R6)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 238

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

```
Thr Lys Asp Trp Gln Thr Ile Glu Ala Asp Tyr Ser Pro Thr Leu Asp
            180                 185                 190
Val Asp Lys Ile Lys Leu Glu Leu Phe Tyr Glu Thr Gly Thr Gly Thr
        195                 200                 205
Val Ser Phe Lys Asp Ile Glu Leu Val Glu Val Ala Asp Gln Pro Ser
    210                 215                 220
Glu Asp Ser Gln Thr Asp Lys Gln Leu Glu Glu Lys Ile Asp Leu Pro
225                 230                 235                 240
Ile Gly Lys Lys His Val Phe Ser Leu Ala Asp Tyr Thr Tyr Lys Val
                245                 250                 255
Glu Asn Pro Asp Val Ala Ser Val Lys Asn Gly Ile Leu Glu Pro Leu
            260                 265                 270
Lys Glu Gly Thr Thr Asn Val Ile Val Ser Lys Asp Gly Lys Glu Val
        275                 280                 285
Lys Lys Ile Pro Leu Lys Ile Leu Ala Ser Val Lys Asp Thr Tyr Thr
    290                 295                 300
Asp Arg Leu Asp Asp Trp Asn Gly Ile Ile Ala Gly Asn Gln Tyr Tyr
305                 310                 315                 320
Asp Ser Lys Asn Glu Gln Met Ala Lys Leu Asn Gln Glu Leu Glu Gly
                325                 330                 335
Lys Val Ala Asp Ser Leu Ser Ser Ile Ser Ser Gln Ala Asp Arg Ile
            340                 345                 350
Tyr Leu Trp Glu Lys Phe Ser Asn Tyr Lys Thr Ser Ala Asn Leu Thr
        355                 360                 365
Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Glu Glu Met Ala Lys Gln Val Thr Asn Pro
    370                 375                 380
Ser Ser Arg Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Val Val Arg Thr Val Arg Asp
385                 390                 395                 400
Ser Met Glu Trp Met His Lys His Val Tyr Asn Ser Glu Lys Ser Ile
                405                 410                 415
Val Gly Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Arg Ala Ile Asn
            420                 425                 430
Asn Thr Leu Ser Leu Met Lys Glu Tyr Phe Ser Asp Glu Glu Ile Lys
        435                 440                 445
Lys Tyr Thr Asp Val Ile Glu Lys Phe Val Pro Asp Pro Glu His Phe
    450                 455                 460
Arg Lys Thr Thr Asp Asn Pro Phe Lys Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val
465                 470                 475                 480
Asp Met Gly Arg Val Lys Val Ile Ala Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asp
                485                 490                 495
Gln Glu Ile Ser Ser Thr Ile Arg Ser Ile Glu Gln Val Phe Lys Leu
            500                 505                 510
Val Asp Gln Gly Glu Gly Phe Tyr Gln Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His
        515                 520                 525
Thr Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly
    530                 535                 540
Leu Ser Gln Leu Leu Pro Val Ile Gln Lys Thr Lys Asn Pro Ile Asp
545                 550                 555                 560
Lys Asp Lys Met Gln Thr Met Tyr His Trp Ile Asp Lys Ser Phe Ala
                565                 570                 575
Pro Leu Leu Val Asn Gly Glu Leu Met Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser
            580                 585                 590
Ile Ser Arg Ala Asn Ser Glu Gly His Val Ala Ala Val Glu Val Leu
        595                 600                 605
Arg Gly Ile His Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu Gly Glu Thr Lys Gln
    610                 615                 620
Arg Leu Gln Ser Leu Val Lys Thr Ile Val Gln Ser Asp Ser Tyr Tyr
625                 630                 635                 640
Asp Val Phe Lys Asn Leu Lys Thr Tyr Lys Asp Ile Ser Leu Met Gln
                645                 650                 655
Ser Leu Leu Ser Asp Ala Gly Val Ala Ser Val Pro Arg Thr Ser Tyr
            660                 665                 670
Leu Ser Ala Phe Asn Lys Met Asp Lys Thr Ala Met Tyr Asn Ala Glu
```

```
        675                 680                 685
Lys Gly Phe Gly Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser Ser Arg Thr Leu Asn
    690                 695                 700
Tyr Glu His Met Asn Lys Glu Asn Lys Arg Gly Trp Tyr Thr Ser Asp
705                 710                 715                 720
Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Gly Asp Leu Ser His Tyr Ser Asp Gly
                725                 730                 735
Tyr Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Pro Gly Thr Thr Glu Thr
            740                 745                 750
Asp Ala Lys Arg Ala Asp Ser Asp Thr Gly Lys Val Leu Pro Ser Ala
        755                 760                 765
Phe Val Gly Thr Ser Lys Leu Asp Asp Ala Asn Ala Thr Ala Thr Met
    770                 775                 780
Asp Phe Thr Asn Trp Asn Gln Thr Leu Thr Ala His Lys Ser Trp Phe
785                 790                 795                 800
Met Leu Lys Asp Lys Ile Ala Phe Leu Gly Ser Asn Ile Gln Asn Thr
                805                 810                 815
Ser Thr Asp Thr Ala Ala Thr Thr Ile Asp Gln Arg Lys Leu Glu Ser
            820                 825                 830
Ser Asn Pro Tyr Lys Val Tyr Val Asn Asp Lys Glu Ala Ser Leu Thr
        835                 840                 845
Glu Gln Glu Lys Asp Tyr Pro Glu Thr Gln Ser Val Phe Leu Glu Ser
    850                 855                 860
Ser Asp Ser Lys Lys Asn Ile Gly Tyr Phe Phe Phe Lys Lys Ser Ser
865                 870                 875                 880
Ile Ser Met Ser Lys Ala Leu Glu Lys Gly Ala Trp Lys Asp Ile Asn
                885                 890                 895
Glu Gly Gln Ser Asp Lys Glu Val Glu Asn Glu Phe Leu Thr Ile Ser
            900                 905                 910
Gln Ala His Lys Gln Asn Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Leu Ile Pro
        915                 920                 925
Asn Val Asp Arg Ala Thr Phe Asn Gln Met Ile Lys Glu Leu Glu Ser
    930                 935                 940
Ser Leu Ile Glu Asn Asn Glu Thr Leu Gln Ser Val Tyr Asp Ala Lys
945                 950                 955                 960
Gln Gly Val Trp Gly Ile Val Lys Tyr Asp Asp Ser Val Ser Thr Ile
                965                 970                 975
Ser Asn Gln Phe Gln Val Leu Lys Arg Gly Val Tyr Thr Ile Arg Lys
            980                 985                 990
Glu Gly Asp Glu Tyr Lys Ile Ala Tyr Tyr Asn Pro Glu Thr Gln Glu
        995                 1000                1005
Ser Ala Pro Asp Gln Glu Val Phe Lys Lys Leu Glu Gln Ala Ala Gln
    1010                1015                1020
Pro Gln Val Gln Asn Ser Lys Glu Lys Glu Lys Ser Glu Glu Glu Lys
1025                1030                1035                1040
Asn His Ser Asp Gln Lys Asn Leu Pro Gln Thr Gly Glu Gly Gln Ser
                1045                1050                1055
Ile Leu Ala Ser Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Phe
            1060                1065                1070
Arg Arg Gly Lys Asn Asn
        1075
```

<210> 239

<211> 1067

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae serotip 2 (suş D39/N)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 239

```
Met Gln Thr Lys Thr Lys Lys Leu Ile Val Ser Leu Ser Ser Leu Val
```

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

```
Ser Tyr Ile Asp His Thr Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn
        515                 520                 525
Val Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Leu Pro Val Ile Gln Lys Thr
    530                 535                 540
Lys Asn Pro Ile Asp Lys Asp Lys Met Gln Thr Met Tyr His Trp Ile
545                 550                 555                 560
Asp Lys Ser Phe Ala Pro Leu Leu Val Asn Gly Glu Leu Met Asp Met
                565                 570                 575
Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Ala Asn Ser Glu Gly His Val Ala
            580                 585                 590
Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Ile His Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu
        595                 600                 605
Gly Glu Thr Lys Gln Arg Leu Gln Ser Leu Val Lys Thr Ile Val Gln
    610                 615                 620
Ser Asp Ser Tyr Tyr Asp Val Phe Lys Asn Leu Lys Thr Tyr Lys Asp
625                 630                 635                 640
Ile Ser Leu Met Gln Ser Leu Leu Ser Asp Ala Gly Val Ala Ser Val
                645                 650                 655
Pro Arg Thr Ser Tyr Leu Ser Ala Phe Asn Lys Met Asp Lys Thr Ala
            660                 665                 670
Met Tyr Asn Ala Glu Lys Gly Phe Gly Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser
        675                 680                 685
Ser Arg Thr Leu Asn Tyr Glu His Met Asn Lys Glu Asn Lys Arg Gly
    690                 695                 700
Trp Tyr Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Gly Asp Leu Ser
705                 710                 715                 720
His Tyr Ser Asp Gly Tyr Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Pro
                725                 730                 735
Gly Thr Thr Glu Thr Asp Ala Lys Arg Ala Asp Ser Asp Thr Gly Lys
            740                 745                 750
Val Leu Pro Ser Ala Phe Val Gly Thr Ser Lys Leu Asp Asp Ala Asn
        755                 760                 765
Ala Thr Ala Thr Met Asp Phe Thr Asn Trp Asn Gln Thr Leu Thr Ala
    770                 775                 780
His Lys Ser Trp Phe Met Leu Lys Asp Lys Ile Ala Phe Leu Gly Ser
785                 790                 795                 800
Asn Ile Gln Asn Thr Ser Thr Asp Thr Ala Ala Thr Thr Ile Asp Gln
                805                 810                 815
Arg Lys Leu Glu Ser Ser Asn Pro Tyr Lys Val Tyr Val Asn Asp Lys
            820                 825                 830
Glu Ala Ser Leu Thr Glu Gln Glu Lys Asp Tyr Pro Glu Thr Gln Ser
        835                 840                 845
Val Phe Leu Glu Ser Ser Asp Ser Lys Lys Asn Ile Gly Tyr Phe Phe
    850                 855                 860
Phe Lys Lys Ser Ser Ile Ser Met Ser Lys Ala Leu Gln Lys Gly Ala
865                 870                 875                 880
Trp Lys Asp Ile Asn Glu Gly Gln Ser Asp Lys Glu Val Glu Asn Glu
                885                 890                 895
Phe Leu Thr Ile Ser Gln Ala His Lys Gln Asn Gly Asp Ser Tyr Gly
            900                 905                 910
Tyr Met Leu Ile Pro Asn Val Asp Arg Ala Thr Phe Asn Gln Met Ile
        915                 920                 925
Lys Glu Leu Glu Ser Ser Leu Ile Glu Asn Asn Glu Thr Leu Gln Ser
    930                 935                 940
Val Tyr Asp Ala Lys Gln Gly Val Trp Gly Ile Val Lys Tyr Asp Asp
945                 950                 955                 960
Ser Val Ser Thr Ile Ser Asn Gln Phe Gln Val Leu Lys Arg Gly Val
                965                 970                 975
Tyr Thr Ile Arg Lys Glu Gly Asp Glu Tyr Lys Ile Ala Tyr Tyr Asn
            980                 985                 990
Pro Glu Thr Gln Glu Ser Ala Pro Asp Gln Glu Val Phe Lys Lys Leu
        995                 1000                1005
Glu Gln Ala Ala Gln Pro Gln Val Gln Asn Ser Lys Glu Lys Glu Lys

    1010                1015                1020
Ser Glu Glu Glu Lys Asn His Ser Asp Gln Lys Asn Leu Pro Gln Thr
1025                1030                1035                1040
Gly Glu Gly Gln Ser Ile Leu Ala Ser Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly
                1045                1050                1055
Ala Phe Tyr Leu Phe Arg Arg Gly Lys Asn Asn
            1060                1065
```

<210> 240

<211> 805

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotip M1

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 240

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

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

<210> 241

<211> 780

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotip M2 (suş MGAS10)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 241

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

```
Asp Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val
465                 470                 475                 480
Gln Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu
                485                 490                 495
Ala Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe
            500                 505                 510
Ser Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His
        515                 520                 525
Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu
    530                 535                 540
Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu
545                 550                 555                 560
Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu
                565                 570                 575
Asn Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp
            580                 585                 590
Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala
        595                 600                 605
Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly
    610                 615                 620
Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys
625                 630                 635                 640
Asn Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu
                645                 650                 655
Asn Gln Lys His Pro Tyr Cys Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp
            660                 665                 670
Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu
        675                 680                 685
Glu Ser Asp Asp Pro Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro
    690                 695                 700
Arg Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn
705                 710                 715                 720
Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn
                725                 730                 735
Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Glu Gly Asp Arg Tyr
            740                 745                 750
Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr
        755                 760                 765
Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn
    770                 775                 780
```

<210> 242

<211> 868

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotip M4 (suş MGAS10)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 242

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

```
Phe His Asn Lys Ala Glu Lys Asp Ala Gln Asn Ile Ile Lys Ser Tyr
                100                 105                 110
Gln Glu Pro Asp His Glu Asn Arg Thr Tyr Leu Trp Glu His Ala Lys
            115                 120                 125
Asp Tyr Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Lys Thr Tyr Arg Asn Ile Glu
        130                 135                 140
Lys Ile Ala Lys Gln Ile Thr Asn Pro Glu Ser Cys Tyr Tyr Gln Asp
145                 150                 155                 160
Ser Lys Ala Ile Ala Ile Val Lys Asp Gly Met Ala Phe Met Tyr Glu
                165                 170                 175
His Ala Tyr Asn Leu Asp Arg Glu Asn His Gln Thr Thr Gly Lys Glu
            180                 185                 190
Asn Lys Glu Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Arg Ala Ile
        195                 200                 205
Asn Asn Thr Leu Ser Leu Met Tyr Pro Tyr Phe Thr Gln Glu Glu Ile
    210                 215                 220
Leu Lys Tyr Thr Ala Pro Ile Glu Lys Phe Val Pro Asp Pro Thr Arg
225                 230                 235                 240
Phe Arg Val Arg Ala Ala Asn Phe Pro Pro Phe Glu Ala Asn Ser Gly
                245                 250                 255
Asn Leu Ile Asp Met Gly Arg Val Lys Leu Ile Ser Gly Ile Leu Arg
            260                 265                 270
Lys Asp Asp Leu Glu Ile Ser Asp Thr Ile Lys Ala Ile Glu Lys Val
        275                 280                 285
Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly Phe Tyr Gln Asp Gly Ser Leu
    290                 295                 300
Ile Asp His Val Val Thr Asn Ala Gln Ser Pro Leu Tyr Lys Lys Gly
305                 310                 315                 320
Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu Ser
                325                 330                 335
Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr Lys Ser Pro Ile Glu Ala Asp
            340                 345                 350
Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile Asn His Ser Phe Phe Pro Ile
        355                 360                 365
Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser
    370                 375                 380
Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala Gly Ile Glu Ala Leu Arg Ala
385                 390                 395                 400
Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu Glu Pro His Arg Leu Ala Leu
                405                 410                 415
Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr Gln Gly Asn Val Phe Tyr Asn
            420                 425                 430
Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His Asp Ile Lys Leu Met Lys Glu
        435                 440                 445
Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val Gln Lys Leu Asp Ser Tyr Val
    450                 455                 460
Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu Ala Leu Tyr Asn Asn Lys His
465                 470                 475                 480
Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe Ser Asn Arg Thr Gln Asn Tyr
                485                 490                 495
Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly
            500                 505                 510
Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr
        515                 520                 525
Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu
    530                 535                 540
Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu Asn Ile Lys Thr Asn Tyr Gln
545                 550                 555                 560
Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys
                565                 570                 575
Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp
            580                 585                 590
Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys
```

```
        595                 600                 605
Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys Asn Gln Ser Ser His Lys Ala
    610                 615                 620
Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu Asn Gln Lys His Pro Tyr Cys
625                 630                 635                 640
Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp
                645                 650                 655
Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu Glu Ser Asp Asp Pro Ala Gln
            660                 665                 670
Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro Thr Thr Leu Ser Ile Ser Lys
        675                 680                 685
Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser
    690                 695                 700
Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln
705                 710                 715                 720
Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn
                725                 730                 735
Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp
            740                 745                 750
Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala Ala Val Tyr Asp His Asp Ser
        755                 760                 765
Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Thr Phe Ser
    770                 775                 780
Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe Tyr Ser Phe Pro His Pro Val
785                 790                 795                 800
Lys Gln Asn Gln Gln Gln Lys Leu Ala His Gln Gly Ile Ala Ala Lys
                805                 810                 815
Asn Asn Ala Leu Asn Ser His Lys Ile Pro His Lys Arg Gln Arg Arg
            820                 825                 830
Leu Pro Arg Thr Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Leu Glu Phe Leu Gly Gly
        835                 840                 845
Ala Leu Val Ala Ser Phe Asn His Ile Thr Lys Pro Phe Arg Lys Lys
    850                 855                 860
Asp Leu Arg Ile
865
```

<210> 243

<211> 828

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotip M6

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 243

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

```
    130                 135                 140
Tyr Leu Trp Glu His Ala Lys Asp Tyr Ser Ala Ser Thr Asn Ile Thr
145                 150                 155                 160
Lys Thr Tyr Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ala Lys Gln Ile Thr Asn Pro
                165                 170                 175
Glu Ser Cys Tyr Tyr Gln Asp Ser Lys Ala Ile Ala Ile Val Lys Asp
            180                 185                 190
Gly Met Ala Phe Met Tyr Glu His Ala Tyr Asn Leu Asp Arg Glu Asn
        195                 200                 205
His Gln Thr Thr Gly Lys Glu Asn Lys Glu Asn Trp Trp Val Tyr Glu
    210                 215                 220
Ile Gly Thr Pro Arg Ala Ile Asn Asn Thr Leu Ser Leu Met Tyr Pro
225                 230                 235                 240
Tyr Phe Thr Gln Glu Glu Ile Leu Lys Tyr Thr Ala Pro Ile Glu Lys
                245                 250                 255
Phe Val Pro Asp Pro Thr Arg Phe Arg Val Arg Ala Ala Asn Phe Ser
            260                 265                 270
Pro Phe Glu Ala Asn Ser Gly Asn Leu Ile Asp Met Gly Arg Val Lys
        275                 280                 285
Leu Ile Ser Gly Ile Leu Arg Lys Asp Asp Leu Glu Ile Ser Asp Thr
    290                 295                 300
Ile Lys Ala Ile Glu Lys Val Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly
305                 310                 315                 320
Phe Tyr Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp His Val Val Thr Asn Ala Gln
                325                 330                 335
Ser Pro Leu Tyr Lys Lys Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn
            340                 345                 350
Val Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr
        355                 360                 365
Lys Ser Pro Ile Glu Ala Asp Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile
    370                 375                 380
Asn His Ser Phe Phe Pro Ile Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met
385                 390                 395                 400
Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala
                405                 410                 415
Gly Ile Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu
            420                 425                 430
Glu Pro His Arg Leu Ala Leu Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr
        435                 440                 445
Gln Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His
    450                 455                 460
Asp Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Phe Val Pro Val
465                 470                 475                 480
Gln Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu
                485                 490                 495
Ala Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe
            500                 505                 510
Ser Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His
        515                 520                 525
Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu
    530                 535                 540
Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu
545                 550                 555                 560
Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu
                565                 570                 575
Asn Ile Lys Thr Asp Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp
            580                 585                 590
Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala
        595                 600                 605
Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly
    610                 615                 620
Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys
625                 630                 635                 640
```

```
Asn Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu
                645                 650                 655
Asn Gln Lys His Pro Tyr Cys Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp
            660                 665                 670
Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu
        675                 680                 685
Glu Ser Asp Asp Pro Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro
    690                 695                 700
Thr Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn
705                 710                 715                 720
Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn
                725                 730                 735
Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr
            740                 745                 750
Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr
        755                 760                 765
Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala
    770                 775                 780
Ala Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu
785                 790                 795                 800
Lys Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe
                805                 810                 815
Tyr Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln
            820                 825
```

<210> 244

<211> 556

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotip M12 (suş MGAS2)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 244

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

```
Ile Asn Gly Glu Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser
225                 230                 235                 240
Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp Val Lys His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala
                245                 250                 255
Thr Ala Asp Met Lys Arg Leu Ala Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu
            260                 265                 270
Glu Pro Lys Ser Thr Asp Val Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly
        275                 280                 285
Gly Thr Lys Phe Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu
    290                 295                 300
Asn Gln Asp Lys Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn
305                 310                 315                 320
Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser
                325                 330                 335
Lys Asn Pro Val Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Asp Tyr Lys
            340                 345                 350
Leu Tyr Lys Asp Asp Thr Gln Thr Thr Asn Ser Asp Asn Gln Glu Thr
        355                 360                 365
Asn Ser Leu Phe Leu Glu Ser Thr Asn Ser Thr Gln Asn Asn Ile Gly
    370                 375                 380
Tyr His Phe Leu Asn Glu Ser Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His
385                 390                 395                 400
Thr Gly Lys Trp Ser Asp Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Ile Gln Lys
                405                 410                 415
Thr Asp Glu Tyr Tyr Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Thr Asp Ser
            420                 425                 430
Lys Tyr Ala Tyr Val Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Val Phe Lys
        435                 440                 445
Ser Lys Ala Ser Lys Val Thr Val Val Lys Gln Glu Asp Asp Phe His
    450                 455                 460
Val Val Lys Asp Asn Glu Ser Val Trp Ala Gly Ile Asn Tyr Ser Asp
465                 470                 475                 480
Ser Ala Lys Thr Phe Glu Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala
                485                 490                 495
Lys Gly Met Phe Ile Leu Thr Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys
            500                 505                 510
Ser Phe Tyr Asn Pro Glu Ser Thr Asn Ser Val Ser Asp Ile Glu Ser
        515                 520                 525
Lys Ile Ser Met Thr Gly Tyr Ser Ile Ile Asn Lys Asn Thr Ser Thr
    530                 535                 540
Ser Asn Glu Ser Gly Val Arg Phe Glu Leu Thr Lys
545                 550                 555
```

<210> 245

<211> 635

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotip M12 (suş MGAS2)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 245

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

```
Phe Glu Ala Ser Ser Gly Asn Leu Ile Asp Met Gly Arg Val Lys Leu
                85                  90                  95
Ile Ser Gly Ile Leu Arg Lys Asp Asp Leu Glu Ile Ser Asp Thr Ile
            100                 105                 110
Lys Ala Ile Glu Lys Val Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly Phe
        115                 120                 125
Tyr Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp His Val Val Thr Asn Ala Gln Ser
    130                 135                 140
Pro Leu Tyr Lys Lys Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val
145                 150                 155                 160
Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr Lys
                165                 170                 175
Ser Pro Ile Glu Ala Asp Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile Asn
            180                 185                 190
His Ser Phe Phe Pro Ile Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met Thr
        195                 200                 205
Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala Gly
    210                 215                 220
Ile Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu Glu
225                 230                 235                 240
Pro His Arg Leu Ala Leu Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr Gln
                245                 250                 255
Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His Asp
            260                 265                 270
Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val Gln
        275                 280                 285
Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu Ala
    290                 295                 300
Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe Ser
305                 310                 315                 320
Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His Gly
                325                 330                 335
Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu Gly
            340                 345                 350
His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu Pro
        355                 360                 365
Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu Asn
    370                 375                 380
Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp Asp
385                 390                 395                 400
Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala Ala
                405                 410                 415
Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly Trp
            420                 425                 430
Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys Asn
        435                 440                 445
Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu Asn
    450                 455                 460
Gln Lys His Pro Tyr Cys Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp Leu
465                 470                 475                 480
Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu Glu
                485                 490                 495
Ser Asp Asp Pro Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro Thr
            500                 505                 510
Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn Ile
        515                 520                 525
Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn Thr
    530                 535                 540
Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr Ala
545                 550                 555                 560
Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr Ile
                565                 570                 575
Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala Ala

            580                 585                 590
Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu Lys
        595                 600                 605
Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe Tyr
    610                 615                 620
Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln
625                 630                 635
```

<210> 246

<211> 828

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotip M12 (suş MGAS9)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 246

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

```
        355                 360                 365
Lys Ser Pro Ile Glu Ala Asp Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile
    370                 375                 380
Asn His Ser Phe Phe Pro Ile Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met
385                 390                 395                 400
Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala
                405                 410                 415
Gly Ile Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu
            420                 425                 430
Glu Pro His Arg Leu Ala Leu Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr
        435                 440                 445
Gln Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His
    450                 455                 460
Asp Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val
465                 470                 475                 480
Gln Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu
                485                 490                 495
Ala Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe
            500                 505                 510
Ser Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His
        515                 520                 525
Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu
    530                 535                 540
Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu
545                 550                 555                 560
Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu
                565                 570                 575
Asn Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp
            580                 585                 590
Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala
        595                 600                 605
Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly
    610                 615                 620
Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys
625                 630                 635                 640
Asn Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu
                645                 650                 655
Asn Gln Lys His Pro Tyr Cys Ser Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp
            660                 665                 670
Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu
        675                 680                 685
Glu Ser Asp Asp Pro Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro
    690                 695                 700
Thr Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn
705                 710                 715                 720
Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn
                725                 730                 735
Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr
            740                 745                 750
Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr
        755                 760                 765
Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala
    770                 775                 780
Ala Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu
785                 790                 795                 800
Lys Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe
                805                 810                 815
Tyr Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln
            820                 825
```

<210> 247

<211> 828

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotip M28

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 247

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

```
Gln Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His
    450                 455                 460
Asp Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val
465                 470                 475                 480
Gln Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu
                485                 490                 495
Ala Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe
            500                 505                 510
Ser Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His
        515                 520                 525
Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu
    530                 535                 540
Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu
545                 550                 555                 560
Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu
                565                 570                 575
Asn Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp
            580                 585                 590
Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala
        595                 600                 605
Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly
    610                 615                 620
Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys
625                 630                 635                 640
Asn Gln Ser Ser His Lys Ala Tyr Thr Thr Ile Glu Gln Arg Lys Glu
                645                 650                 655
Asn Gln Lys His Pro Tyr His Ala Tyr Val Asn Asn Gln Pro Val Asp
            660                 665                 670
Leu Asn Asn Gln Leu Val Asp Phe Thr Asn Thr Lys Ser Ile Phe Leu
        675                 680                 685
Glu Ser Asp Asp Ser Ala Gln Asn Ile Gly Tyr Tyr Phe Phe Lys Pro
    690                 695                 700
Thr Thr Leu Ser Ile Ser Lys Ala Leu Gln Thr Gly Lys Trp Gln Asn
705                 710                 715                 720
Ile Lys Ala Asp Asp Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Glu Val Ser Asn
                725                 730                 735
Thr Phe Ile Thr Ile Met Gln Asn His Thr Gln Asp Gly Asp Arg Tyr
            740                 745                 750
Ala Tyr Met Met Leu Pro Asn Met Thr Arg Gln Glu Phe Glu Thr Tyr
        755                 760                 765
Ile Ser Lys Leu Asp Ile Asp Leu Leu Glu Asn Asn Asp Lys Leu Ala
    770                 775                 780
Ala Val Tyr Asp His Asp Ser Gln Gln Met His Val Ile His Tyr Glu
785                 790                 795                 800
Lys Lys Ala Thr Met Phe Ser Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe
                805                 810                 815
Tyr Ser Phe Pro His Pro Val Lys Gln Asn Gln Gln
            820                 825
```

<210> 248

<211> 522

<212> PRT

<213> Streptococcus suis

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 248

```
Met Gly Phe Phe Ile Ser Gln Ser Lys Gln His Tyr Gly Ile Arg Lys
 1               5                  10                  15
Tyr Lys Val Gly Val Cys Ser Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ile Leu Gly
            20                  25                  30
```

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

<210> 249

<211> 1164

<212> PRT

<213> Streptococcus suis

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 249

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

```
            420                 425                 430
Ala Tyr Tyr His Asp Arg Ser Leu Ile Asp Leu Val Arg Lys Gly Met
        435                 440                 445
Asn Trp Leu Tyr Ala Asn Val Tyr Asn Glu Asn Lys Ser Ile Asp Gly
    450                 455                 460
Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Ser Arg Ala Val Val Asn Thr
465                 470                 475                 480
Leu Ile Tyr Met His Pro Tyr Phe Ser Gln Glu Glu Ile Leu Thr Tyr
                485                 490                 495
Thr Lys Pro Ile Ser Lys Phe Val Pro Asp Pro Thr Thr Ile Arg Lys
            500                 505                 510
Thr Leu Thr Asn Pro Val Pro Ala Val Gly Gly Asn Gln Thr Asp Leu
        515                 520                 525
Ser Lys Val Ala Ile Leu Glu Gly Ala Leu Arg Glu Asp Ala Asp Arg
    530                 535                 540
Val Arg Ala Gly Ala Gln Gly Leu Thr Thr Ile Met Lys Phe Val Asp
545                 550                 555                 560
Lys Gly Glu Gly Phe Tyr Arg Asp Gly Ser Phe Ile Asp His Thr Asn
                565                 570                 575
Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Glu Gly Phe Ser
            580                 585                 590
Gln Leu Leu Pro Val Ile Gln Pro Thr Glu Phe Ala Leu Lys Glu Glu
        595                 600                 605
Gln Thr Asn Ile Leu Tyr Glu Trp Ile Glu Lys Ala Phe Met Pro Ile
    610                 615                 620
Leu Val Arg Gly Glu Leu Met Asp Met Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser
625                 630                 635                 640
Arg Ala Thr Gly Glu Ser His Val Gln Ala Met Glu Ile Leu Arg Ser
                645                 650                 655
Leu Val Arg Ile Ala Glu Ser Ala Gln Pro Glu Gln Lys Thr Lys Leu
            660                 665                 670
Leu Ser Phe Val Lys Ala Gln Leu Thr Ser Asp Thr Phe Tyr Asp Ser
        675                 680                 685
Tyr Arg Ser Leu Lys Ser Tyr Lys Asp Ile Asp Leu Val Asn Lys Leu
    690                 695                 700
Leu Ala Asp Asn Gln Ile Pro Ala Glu Val Asp Lys Asp Tyr Ile Ala
705                 710                 715                 720
Ala Phe Asn Asn Met Asp Lys Phe Val Tyr Arg Ser Ala Gln Glu Gly
                725                 730                 735
Phe Thr Phe Ala Leu Ser Met Tyr Ser Ser Arg Thr Gln Asn Tyr Glu
            740                 745                 750
Asp Met Asn Asn Glu Asn Arg Lys Gly Trp Tyr Thr Ala Asp Gly Met
        755                 760                 765
Val Tyr Leu Tyr Asn Asp Asp Leu Ser His Tyr Ser Asn His Tyr Trp
    770                 775                 780
Ala Thr Val Asp Pro Tyr Arg Leu Pro Gly Thr Thr Thr Thr Lys Asp
785                 790                 795                 800
Lys Arg Glu Asp Gly Ser Gly Glu Val Thr Leu Ala Ser Asp Phe Val
                805                 810                 815
Gly Ala Ser Gln Leu Gly Asn Arg Leu Ala Thr Ile Ala Met Asp Phe
            820                 825                 830
Asn Asn Trp Asn Asn Ser Leu Thr Ala Arg Lys Ala Trp Ile Val Leu
        835                 840                 845
Gly Asn Lys Ile Val Phe Leu Gly Thr Asp Ile Gln His Gln Ser Ala
    850                 855                 860
Gln Gly Ala Glu Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Leu Leu Thr Gly Glu
865                 870                 875                 880
Lys Tyr Ser Tyr Tyr Ile Asn Gly Gln Pro Val Asp Leu Ser Lys Glu
                885                 890                 895
Val Val Thr Asp Lys Thr Gln Ser Phe Tyr Met Thr Asn Gly Lys Asp
            900                 905                 910
Asn Gln Ser Ile Gly Tyr Val Phe Leu Asn Gln Leu Pro Thr His Ala
        915                 920                 925
```

```
Lys Leu Asp Gln Arg Thr Gly Lys Trp Ser Asp Ile Asn Tyr Asn Gln
    930                 935                 940
Ser Lys Glu Glu Val Ser Asn Ser Phe Val Ser Leu Trp His Glu His
945                 950                 955                 960
Ala Gln Thr Ser Ser Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Val Pro Asn Gln Ser
                965                 970                 975
Met Glu Lys Val Asn Gln Ala Ala Ala Ser Val Lys Leu Leu His Gln
            980                 985                 990
Asp Arg Asp Leu Gln Val Val Tyr Asp Gln Glu Gln Asn Val Trp Gly
        995                 1000                1005
Val Val Lys Tyr Thr Asp Thr Ala Tyr Lys Leu Thr Asp Asp Ile Thr
    1010                1015                1020
Leu Thr Asp Ala Gly Leu Tyr Thr Ile Gln Lys Val Glu Gly Gly Tyr
1025                1030                1035                1040
Arg Ile Ala Phe Tyr Asn Pro Ser Thr Arg Thr Val Lys Asn Gly Ile
                1045                1050                1055
Glu Leu Thr Lys Ala Gly Ser Ser Leu Thr Val Glu Met Glu Pro Thr
            1060                1065                1070
Ala Ala Tyr Pro Ser Thr Val Trp Lys Val Thr Met Pro Glu Gly Ser
        1075                1080                1085
Asp Lys Gln Thr Gly Ser Val Glu Lys Thr Glu Lys Glu Glu Lys Gln
    1090                1095                1100
Leu Lys Glu Asn Gln Pro Ser Ser Glu Val Lys Gln Val Val His His
1105                1110                1115                1120
Ala Ala Glu Lys Thr Lys Pro Ser Lys Pro Arg Leu Pro Gln Thr Gly
                1125                1130                1135
Glu Glu Ala Ser Leu Gly Leu Gly Phe Leu Gly Leu Leu Thr Leu Gly
            1140                1145                1150
Ala Val Val Asp Phe Lys Cys Arg Arg Ser His Ser
        1155                1160
```

<210> 250

<211> 1164

<212> PRT

<213> Streptococcus suis

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 250

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

```
Leu Phe Ser Tyr Asp Val Glu Thr Lys Asp Leu Lys Gly Ser Gly Val
            180                 185                 190
Arg Val Arg Leu Arg Ser Leu Thr Ala Glu Gly Lys Asp Leu Ser Pro
        195                 200                 205
Gln Glu Phe Ala Tyr Thr Pro Tyr Lys Asn Gly Ser Gln Ala Glu His
    210                 215                 220
Ile Glu Gln Ile Leu Thr Val Ser Pro Glu Thr Arg Lys Leu Lys Val
225                 230                 235                 240
Glu Leu Phe Phe Glu Asn Ser Val Gly Gln Ala Trp Leu Asp Asn Ile
                245                 250                 255
Ser Leu Val Glu Tyr Val Glu Lys Thr Pro Glu Thr Pro Glu Gln Ser
            260                 265                 270
Pro Glu Leu Val Gln Pro Glu Thr Gly Gln Ile Ser Leu Ala Ser Asn
        275                 280                 285
Lys Val Tyr Leu Pro Val Arg Pro Asp Leu Thr Tyr Arg Ile Ala Asp
    290                 295                 300
Ala Ala Val Ala Thr Val Glu Lys Asn Met Ile Arg Pro Leu Ala Ala
305                 310                 315                 320
Gly Lys Thr Gln Val Asp Val Tyr Asp Lys Asp Thr Lys Leu Ser Ser
                325                 330                 335
Phe Glu Leu Ile Val Thr Glu His Gln Ala Thr Val Phe Asp Thr Leu
            340                 345                 350
Arg Asn Asn Trp Glu Asp Ile Ser Leu Ala Asn Lys Arg Tyr Gln Ser
        355                 360                 365
Asn Asp Ala Gln Met Lys Ala Phe Leu Gly Arg Leu Asp Ala Gly Val
    370                 375                 380
Ala Ser Ser Leu Glu Lys Trp Val Glu Pro Thr Glu Gln Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400
Ile Phe Asn Asp Ile Asp Phe Ser Lys Ser Ser His Leu Thr Thr Val
                405                 410                 415
Tyr Arg Arg Leu Glu Gln Met Ala Gln Val Val Glu Asn Pro Asp Ser
            420                 425                 430
Ala Tyr Tyr His Asp Arg Ser Leu Ile Asp Leu Val Arg Lys Gly Met
        435                 440                 445
Asn Trp Leu Tyr Thr Asn Val Tyr Asn Glu Asn Lys Ser Ile Asp Gly
    450                 455                 460
Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Arg Ala Val Val Asn Thr
465                 470                 475                 480
Leu Ile Tyr Met His Pro Tyr Phe Ser Gln Glu Glu Ile Leu Thr Tyr
                485                 490                 495
Thr Lys Pro Ile Ser Lys Phe Val Pro Asp Pro Thr Thr Ile Arg Lys
            500                 505                 510
Thr Leu Thr Asn Pro Val Pro Ala Val Gly Gly Asn Gln Thr Asp Leu
        515                 520                 525
Ser Lys Val Ala Ile Leu Glu Gly Ala Leu Arg Glu Asp Ala Asp Arg
    530                 535                 540
Val Arg Ala Gly Ala Gln Gly Leu Thr Thr Ile Met Lys Phe Val Asp
545                 550                 555                 560
Lys Gly Glu Gly Phe Tyr Arg Asp Gly Ser Phe Ile Asp His Thr Asn
                565                 570                 575
Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Glu Gly Phe Ser
            580                 585                 590
Gln Leu Leu Pro Val Ile Gln Pro Thr Glu Phe Ala Leu Lys Glu Glu
        595                 600                 605
Gln Thr Asn Ile Leu Tyr Glu Trp Ile Glu Lys Ala Phe Met Pro Ile
    610                 615                 620
Leu Val Arg Gly Glu Leu Met Asp Met Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser
625                 630                 635                 640
Arg Ala Thr Gly Glu Ser His Val Gln Ala Met Glu Ile Leu Arg Ser
                645                 650                 655
Leu Val Arg Ile Ala Glu Ser Ala Gln Pro Glu Gln Lys Thr Lys Leu
            660                 665                 670
Leu Ser Phe Val Lys Ala Gln Leu Thr Ser Asp Thr Phe Tyr Asp Ser
```

```
        675                 680                 685
Tyr Arg Ser Leu Lys Ser Tyr Lys Asp Ile Asp Leu Val Asn Lys Leu
    690                 695                 700
Leu Ala Asp Asn Gln Ile Pro Ala Glu Val Asp Lys Asp Tyr Ile Ala
705                 710                 715                 720
Ala Phe Asn Asn Met Asp Lys Phe Val Tyr Arg Ser Ala Gln Glu Gly
                725                 730                 735
Phe Thr Phe Ala Leu Ser Met Tyr Ser Ser Arg Thr Gln Asn Tyr Glu
            740                 745                 750
Asp Met Asn Asn Glu Asn Arg Lys Gly Trp Tyr Thr Ala Asp Gly Met
        755                 760                 765
Val Tyr Leu Tyr Asn Asp Asp Leu Ser His Tyr Ser Asn His Tyr Trp
    770                 775                 780
Ala Thr Val Asp Pro Tyr Arg Leu Pro Gly Thr Thr Thr Thr Lys Asp
785                 790                 795                 800
Lys Arg Glu Asp Gly Ser Gly Glu Val Thr Leu Ala Ser Asp Phe Val
                805                 810                 815
Gly Ala Ser Gln Leu Gly Asn Arg Leu Ala Thr Ile Ala Met Asp Phe
            820                 825                 830
Asn Asn Trp Asn Asn Ser Leu Thr Ala Arg Lys Ala Trp Ile Val Leu
        835                 840                 845
Gly Asn Lys Ile Val Phe Leu Gly Thr Asp Ile Gln His Gln Ser Ala
    850                 855                 860
Gln Gly Ala Glu Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Leu Leu Thr Gly Glu
865                 870                 875                 880
Lys Tyr Ser Tyr Tyr Ile Asn Gly Gln Pro Val Asp Leu Ser Lys Glu
                885                 890                 895
Val Val Thr Asp Lys Thr Gln Ser Phe Tyr Met Thr Asn Gly Lys Asp
            900                 905                 910
Asn Gln Ser Ile Gly Tyr Val Phe Leu Asn Gln Leu Pro Thr His Ala
        915                 920                 925
Lys Leu Asp Gln Arg Thr Gly Lys Trp Ser Asp Ile Asn Tyr Asn Gln
    930                 935                 940
Ser Lys Glu Glu Val Ser Asn Ser Phe Val Ser Leu Trp His Glu His
945                 950                 955                 960
Ala Gln Thr Ser Ser Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Val Pro Asn Gln Ser
                965                 970                 975
Met Glu Lys Val Asn Gln Ala Ala Ala Ser Val Lys Leu Leu His Gln
            980                 985                 990
Asp Arg Asp Leu Gln Val Val Tyr Asp Gln Glu Gln Asn Val Trp Gly
        995                 1000                1005
Val Val Lys Tyr Thr Asp Thr Ala Tyr Lys Leu Thr Asp Asp Ile Thr
    1010                1015                1020
Leu Thr Asp Ala Gly Leu Tyr Thr Ile Gln Lys Val Glu Gly Gly Tyr
1025                1030                1035                1040
Arg Ile Ala Phe Tyr Asn Pro Ser Thr Arg Thr Val Lys Asn Gly Ile
                1045                1050                1055
Glu Leu Thr Lys Ala Gly Ser Ser Leu Thr Val Glu Met Glu Pro Thr
            1060                1065                1070
Ala Ala Tyr Pro Ser Thr Val Trp Lys Val Thr Met Pro Glu Gly Ser
        1075                1080                1085
Asp Lys Gln Thr Gly Ser Val Glu Lys Thr Glu Lys Glu Glu Lys Gln
    1090                1095                1100
Leu Lys Glu Asn Gln Pro Ser Ser Glu Val Lys Gln Val Val His His
1105                1110                1115                1120
Ala Ala Glu Lys Thr Lys Pro Ser Lys Pro Arg Leu Pro Gln Thr Gly
                1125                1130                1135
Glu Glu Ala Ser Leu Gly Leu Gly Phe Leu Gly Leu Leu Thr Leu Gly
            1140                1145                1150
Ala Val Val Asp Phe Lys Cys Arg Arg Ser His Ser
        1155                1160
```

<210> 251

<211> 802

<212> PRT

<213> Vibrio fischeri (suş ATCC 700601 / ES114)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 251

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

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

<210> 252

<211> 517

<212> PRT

<213> Synechococcus sp. (suş RCC307)

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 252

```
Met Gly Ala Pro Ala Ile Pro Lys Val Pro Arg Ser Pro Ser Lys Ser
 1               5                  10                  15
Glu His Thr Thr Arg Pro Asn Ser Gly Glu Ser Glu Val Val Arg Gln
            20                  25                  30
```

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

<210> 253

<211> 1021

<212> PRT

<213> Proteus vulgaris kondroitin-sülfat-ABC endoliyaz

<220>

<223> Hiyalüronan liyaz

<400> 253

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

```
            420                 425                 430
Asp Met Lys Val Ser Ala Asp Ser Ser Asp Leu Asp Tyr Phe Asn Thr
        435                 440                 445
Leu Ser Arg Gln His Leu Ala Leu Leu Leu Leu Glu Pro Asp Asp Gln
    450                 455                 460
Lys Arg Ile Asn Leu Val Asn Thr Phe Ser His Tyr Ile Thr Gly Ala
465                 470                 475                 480
Leu Thr Gln Val Pro Pro Gly Gly Lys Asp Gly Leu Arg Pro Asp Gly
                485                 490                 495
Thr Ala Trp Arg His Glu Gly Asn Tyr Pro Gly Tyr Ser Phe Pro Ala
            500                 505                 510
Phe Lys Asn Ala Ser Gln Leu Ile Tyr Leu Leu Arg Asp Thr Pro Phe
        515                 520                 525
Ser Val Gly Glu Ser Gly Trp Asn Asn Leu Lys Lys Ala Met Val Ser
    530                 535                 540
Ala Trp Ile Tyr Ser Asn Pro Glu Val Gly Leu Pro Leu Ala Gly Arg
545                 550                 555                 560
His Pro Phe Asn Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr
                565                 570                 575
Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser
            580                 585                 590
Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile
        595                 600                 605
Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala
    610                 615                 620
Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val
625                 630                 635                 640
Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn
                645                 650                 655
Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile
            660                 665                 670
Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp
        675                 680                 685
Asp Trp Asn Arg Met Glu Gly Ala Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys
    690                 695                 700
Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg
705                 710                 715                 720
Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala
                725                 730                 735
Phe Asn Leu Ile Tyr Pro Ala Asn Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe
            740                 745                 750
Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile
        755                 760                 765
Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr
    770                 775                 780
Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn
785                 790                 795                 800
Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly
                805                 810                 815
Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala
            820                 825                 830
Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln His Gln Val Ser Ala Glu Asn Lys
        835                 840                 845
Asn Arg Gln Pro Thr Glu Gly Asn Phe Ser Ser Ala Trp Ile Asp His
    850                 855                 860
Ser Thr Arg Pro Lys Asp Ala Ser Tyr Glu Tyr Met Val Phe Leu Asp
865                 870                 875                 880
Ala Thr Pro Glu Lys Met Gly Glu Met Ala Gln Lys Phe Arg Glu Asn
                885                 890                 895
Asn Gly Leu Tyr Gln Val Leu Arg Lys Asp Lys Asp Val His Ile Ile
            900                 905                 910
Leu Asp Lys Leu Ser Asn Val Thr Gly Tyr Ala Phe Tyr Gln Pro Ala
        915                 920                 925
```

```
Ser Ile Glu Asp Lys Trp Ile Lys Lys Val Asn Lys Pro Ala Ile Val
    930                 935                 940
Met Thr His Arg Gln Lys Asp Thr Leu Ile Val Ser Ala Val Thr Pro
945                 950                 955                 960
Asp Leu Asn Met Thr Arg Gln Lys Ala Ala Thr Pro Val Thr Ile Asn
                965                 970                 975
Val Thr Ile Asn Gly Lys Trp Gln Ser Ala Asp Lys Asn Ser Glu Val
            980                 985                 990
Lys Tyr Gln Val Ser Gly Asp Asn Thr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Tyr
        995                 1000                1005
Phe Gly Ile Pro Gln Glu Ile Lys Leu Ser Pro Leu Pro
    1010                1015                1020
```

<210> 254

<211> 684

<212> PRT

<213> Pedobacter heparinus

<220>

<223> kondroitin AC liyaz

<400> 254

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

```
Glu Pro Tyr His His Gln Phe Trp Asn Gly Asp Tyr Val Gln His Leu
                325                 330                 335
Arg Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Val Arg Met Val Ser Lys Arg Thr Arg
            340                 345                 350
Arg Ser Glu Ser Gly Asn Lys Glu Asn Leu Leu Gly Arg Tyr Leu Ser
        355                 360                 365
Asp Gly Ala Thr Asn Ile Gln Leu Arg Gly Pro Glu Tyr Tyr Asn Ile
    370                 375                 380
Met Pro Val Trp Glu Trp Asp Lys Ile Pro Gly Ile Thr Ser Arg Asp
385                 390                 395                 400
Tyr Leu Thr Asp Arg Pro Leu Thr Lys Leu Trp Gly Glu Gln Gly Ser
                405                 410                 415
Asn Asp Phe Ala Gly Gly Val Ser Asp Gly Val Tyr Gly Ala Ser Ala
            420                 425                 430
Tyr Ala Leu Asp Tyr Asp Ser Leu Gln Ala Lys Lys Ala Trp Phe Phe
        435                 440                 445
Phe Asp Lys Glu Ile Val Cys Leu Gly Ala Gly Ile Asn Ser Asn Ala
    450                 455                 460
Pro Glu Asn Ile Thr Thr Thr Leu Asn Gln Ser Trp Leu Asn Gly Pro
465                 470                 475                 480
Val Ile Ser Thr Ala Gly Lys Thr Gly Arg Gly Lys Ile Thr Thr Phe
                485                 490                 495
Lys Ala Gln Gly Gln Phe Trp Leu Leu His Asp Ala Ile Gly Tyr Tyr
            500                 505                 510
Phe Pro Glu Gly Ala Asn Leu Ser Leu Ser Thr Gln Ser Gln Lys Gly
        515                 520                 525
Asn Trp Phe His Ile Asn Asn Ser His Ser Lys Asp Glu Val Ser Gly
    530                 535                 540
Asp Val Phe Lys Leu Trp Ile Asn His Gly Ala Arg Pro Glu Asn Ala
545                 550                 555                 560
Gln Tyr Ala Tyr Ile Val Leu Pro Gly Ile Asn Lys Pro Glu Glu Ile
                565                 570                 575
Lys Lys Tyr Asn Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu Ala Asn Thr Asn Gln
            580                 585                 590
Leu Gln Ala Val Tyr His Gln Gln Leu Asp Met Val Gln Ala Ile Phe
        595                 600                 605
Tyr Thr Ala Gly Lys Leu Ser Val Ala Gly Ile Glu Ile Glu Thr Asp
    610                 615                 620
Lys Pro Cys Ala Val Leu Ile Lys His Ile Asn Gly Lys Gln Val Ile
625                 630                 635                 640
Trp Ala Ala Asp Pro Leu Gln Lys Glu Lys Thr Ala Val Leu Ser Ile
                645                 650                 655
Arg Asp Leu Lys Thr Gly Lys Thr Asn Arg Val Lys Ile Asp Phe Pro
            660                 665                 670
Gln Gln Glu Phe Ala Gly Ala Thr Val Glu Leu Lys
        675                 680
```

<210> 255

<211> **844**

<212> **PRT**

<213> Victivallis vadensis ATCC BAA-548

<220>

<223> kondroitin AC liyaz

<400> 255

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

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

```
545                 550                 555                 560
Ala Cys Trp Asp Trp Thr Arg Leu Pro Gly Thr Thr Leu Pro Lys Thr
                565                 570                 575
Pro Val Tyr Thr Gly Glu Asp Ala Arg Arg Phe Gly Leu Lys Ile Gly
            580                 585                 590
Gly Gly Asp Leu Pro Arg Trp Thr His Ser Arg Asn Trp Arg Gln Leu
        595                 600                 605
Gly Glu Thr Gly Phe Val Gly Gly Val Thr Asp Gly Glu Arg Gly Ala
    610                 615                 620
Ala Val Tyr Thr Gln Asp Leu Asp Gly Val Arg Ala Arg Lys Ala Trp
625                 630                 635                 640
Phe Phe Asp Arg Asp Ala Ile Tyr Cys Leu Gly Ser Gly Ile Thr Ser
                645                 650                 655
Thr Ser Pro Tyr Glu Val Ala Thr Thr Val Asn Ser Cys Leu Arg Asn
            660                 665                 670
Gly Glu Ile Gln Gln Gly Asp Gly Trp Phe Arg His Asp Gly Ile Gly
        675                 680                 685
Tyr Arg Gly Glu Asn Leu Lys Leu Thr Ala Gly Pro Arg Thr Gly Asp
    690                 695                 700
Trp Arg Tyr Val Glu Gly Gly Leu Thr Arg Pro Val Pro Glu Thr Lys
705                 710                 715                 720
Glu Leu Phe Thr Leu Thr Val Glu His Gly Val Lys Pro Arg Asn Ala
                725                 730                 735
Ser Tyr Ile Tyr Thr Ile Leu Pro Gly Ala Thr Pro Glu Glu Thr Ala
            740                 745                 750
Gly Thr Pro Pro Gly Arg Val Leu Arg Asn Thr Pro Glu Cys Gln Ala
        755                 760                 765
Val Glu Phe Ala Asp Gly Val Arg Ala Ala Ile Phe Tyr Glu Pro Gly
    770                 775                 780
Arg Leu Asp Asp Phe Glu Thr Asp Thr Pro Gly Val Phe Leu Ile Gly
785                 790                 795                 800
Lys Gly Thr Val His Ala Ala Asp Pro Thr Gly Arg His Ser Ser Phe
                805                 810                 815
Thr Leu Lys Leu Asn Gly Val Ser Arg Lys Val Pro Leu Pro Ala Gly
            820                 825                 830
Glu Phe Ala Gly Gln Ser Val Lys Ile Val Leu Lys
        835                 840
```

<210> 256

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-465

<400> 256

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

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

<210> 257

<211> 466

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-466

<400> 257

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

```
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  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
465
```

<210> 258

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-467

<400> 258

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

<210> 259

<211> 468

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-468

<400> 259

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

Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe
465
```

<210> 260

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-469

<400> 260

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

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

<210> 261

<211> 470

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-470

<400> 261

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

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

<210> 262

<211> 471

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-471

<400> 262

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

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

<210> 263

<211> 472

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-472

<400> 263

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

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

<210> 264

<211> 473

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-473

<400> 264

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

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

<210> 265

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-474

<400> 265

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

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

<210> 266

<211> 475

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-475

<400> 266

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

<210> 267

<211> 476

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-476

<400> 267

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

<210> 268

<211> 477

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-477

<400> 268

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

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

<210> 269

<211> 478

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-478

<400> 269

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

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

<210> 270

<211> 479

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-479

<400> 270

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

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

<210> 271

<211> 480

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-480

<400> 271

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

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

<210> 272

<211> 481

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-481

<400> 272

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

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

<210> 273

<211> 482

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> öncü PH20 1-482

<400> 273

```
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
```

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

<210> 274

<211> 483

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-483

<400> 274

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

```
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn
```

<210> 275

<211> 484

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-484

<400> 275

```
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
```

<210> 276

<211> 485

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-485

<400> 276

```
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    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
                485
```

<210> 277

<211> 486

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-486

<400> 277

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

```
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro
                485
```

<210> 278

<211> 487

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-487

<400> 278

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

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

<210> 279

<211> 488

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-488

<400> 279

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

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

<210> 280

<211> 489

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-489

<400> 280

```
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
                485
```

<210> 281

<211> 490

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 öncü 1-490

<400> 281

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

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

<210> 282

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tremelimumab VH CDR1

<400> 282

```
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
 1               5                  10
```

<210> 283

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tremelimumab VH CDR2

<400> 283

```
Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1               5                  10                  15
```

<210> 284

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tremelimumab VH CDR3

<400> 284

Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 285

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tremelimumab VL CDR1

<400> 285

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp
1 5 10

<210> 286

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tremelimumab VL CDR2

<400> 286

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 287

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tremelimumab VL CDR3

<400> 287

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 288

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IgG1 ağır zincir sabit bölgesi

<220>

<221> SAHA

<222> (1)...(98)

<223> CH1

<220>

<221> SAHA

<222> (99)...(113)

<223> menteşe bölgesi

<220>

<221> SAHA

<222> (114)...(223)

<223> CH2

<220>

<221> SAHA

<222> (224)...(328)

<223> CH3

<400> 288

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
```

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

<210> 289

<211> 330

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Setuksimab R216 ağır zincir sabit sahası

<220>

<221> SAHA

<222> (1)...(98)

<223> CH1

<220>

<221> SAHA

<222> (99)...(113)

<223> menteşe bölgesi

<220>

<221> SAHA

<222> (114)...(223)

<223> CH2

<220>

<221> SAHA

<222> (224)...(328)

<223> CH3

<400> 289

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

<210> 290

<211> 333

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Setuksimab R216 Ins222PKS ağır zincir sabit sahası

<220>

<221> SAHA

<222> (1)...(98)

<223> CH1

<220>

<221> SAHA

<222> (99)...(116)

<223> menteşe bölgesi

<220>

<221> SAHA

<222> (117)...(226)

<223> CH2

<220>

<221> SAHA

<222> (227)...(331)

<223> CH3

<400> 290

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

<210> 291

<211> 330

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Setuksimab K216 ağır zincir sabit sahası

<220>

<221> SAHA

<222> (1)...(98)

<223> CH1

<220>

<221> SAHA

<222> (99)...(113)

<223> menteşe bölgesi

<220>

<221> SAHA

<222> (114)...(223)

<223> CH2

<220>

<221> SAHA

<222> (224)...(328)

<223> CH3

<400> 291

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

```
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 292

<211> 330

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Setuksimab R216 E358 M360 ağır zincir sabit sahası

<220>

<221> SAHA

<222> (1)...(98)

<223> CH1

<220>

<221> SAHA

<222> (99)...(113)

<223> menteşe bölgesi

<220>

<221> SAHA

<222> (114)...(223)

<223> CH2

<220>

<221> SAHA

<222> (224)...(328)

<223> CH3

<400> 292

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


        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 293

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beşeri IgG2

<220>

<221> SAHA

<222> (1)...(98)

<223> CH1

<220>

<221> SAHA

<222> (99)...(110)

<223> menteşe bölgesi

<220>

<221> SAHA

<222> (111)...(219)

<223> CH2

<220>

<221> SAHA

<222> (220)...(326)

<223> CH3

<400> 293

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

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

<210> 294

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beşeri IgG3

<220>

<221> SAHA

<222> (1)...(98)

<223> CH1

<220>

<221> SAHA

<222> (99)...(160)

<223> menteşe bölgesi

<220>

<221> SAHA

<222> (161)...(270)

<223> CH2

<220>

<221> SAHA

<222> (271)...(386)

<223> CH3

<400> 294

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser


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

<210> 295

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beşeri IgG4

<220>

<221> SAHA

<222> (1)...(98)

<223> CH1

<220>

<221> SAHA

<222> (99)...(110)

<223> menteşe bölgesi

<220>

<221> SAHA

<222> (111)...(220)

<223> CH2

<220>

<221> SAHA

<222> (221)...(327)

<223> CH3

<400> 295

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

<210> 296

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beşeri kappa hafif zincir sabit sahası

<400> 296

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

<210> 297

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beşeri lambda hafif zincir sabit sahası

<400> 297

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

<210> 298

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Setuksimab A213 kappa hafif zincir sabit sahası

<400> 298

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Ala
            100                 105
```

<210> 299

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<308> UniProt: Q15116.3

<309> 2014-07-09

<400> 299

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

<210> 300

<211> 371

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes bakteriyofaj H4489A

<220>

<223> hiyalüronidaz

<400> 300

```
Met Thr Glu Asn Ile Pro Leu Arg Val Gln Phe Lys Arg Met Ser Ala
```

```
 1               5                  10                  15
Asp Glu Trp Ala Arg Ser Asp Val Ile Leu Leu Glu Gly Glu Ile Gly
            20                  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
```

<210> 301

<211> 1628

<212> PRT

<213> Clostridium perfringens

<220>

<223> hiyalüronidaz

<400> 301

```
Met Asn Lys Asn Ile Arg Lys Ile Ile Thr Ser Thr Val Leu Ala Ala
 1               5                  10                  15
Met Thr Ile Ser Val Leu Pro Ser Asn Leu Val Val Phe Ala Thr Asp
            20                  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> 302

<211> 1439

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beşeri Tümör nekroz faktörünün stimüle ettiği gen-6 (TSG-6) preprotein kodlayıcı DNA GI No. 315139000

<400> 302

```
agtcacattt cagccactgc tctgagaatt tgtgagcagc ccctaacagg ctgttacttc 60
actacaactg acgatatgat catcttaatt tacttatttc tcttgctatg ggaagacact 120
caaggatggg gattcaagga tggaattttt cataactcca tatggcttga acgagcagcc 180
ggtgtgtacc acagagaagc acggtctggc aaatacaagc tcacctacgc agaagctaag 240
gcggtgtgtg aatttgaagg cggccatctc gcaacttaca agcagctaga ggcagccaga 300
aaaattggat ttcatgtctg tgctgctgga tggatggcta agggcagagt tggatacccc 360
attgtgaagc cagggcccaa ctgtggattt ggaaaaactg gcattattga ttatggaatc 420
cgtctcaata ggagtgaaag atgggatgcc tattgctaca acccacacgc aaaggagtgt 480
ggtggcgtct ttacagatcc aaagcaaatt tttaaatctc caggcttccc aaatgagtac 540
gaagataacc aaatctgcta ctggcacatt agactcaagt atggtcagcg tattcacctg 600
agttttttag attttgacct tgaagatgac ccaggttgct tggctgatta tgttgaaata 660
tatgacagtt acgatgatgt ccatggcttt gtgggaagat actgtggaga tgagcttcca 720
gatgacatca tcagtacagg aaatgtcatg accttgaagt ttctaagtga tgcttcagtg 780
acagctggag gtttccaaat caaatatgtt gcaatggatc ctgtatccaa atccagtcaa 840
ggaaaaaata caagtactac ttctactgga aataaaaact ttttagctgg aagatttagc 900
cacttataaa aaaaaaaaaa aggatgatca aaacacacag tgtttatgtt ggaatctttt 960
ggaactcctt tgatctcact gttattatta acatttattt attatttttc taaatgtgaa 1020
agcaatacat aatttaggga aaattggaaa atataggaaa ctttaaacga gaaaatgaaa 1080
cctctcataa tcccactgca tagaaataac aagcgttaac attttcatat ttttttcttt 1140
cagtcatttt tctatttgtg gtatatgtat atatgtacct atatgtattt gcatttgaaa 1200
ttttggaatc ctgctctatg tacagttttg tattatactt tttaaatctt gaactttata 1260
aacatttttct gaaatcattg attattctac aaaaacatga ttttaaacag ctgtaaaata 1320
ttctatgata tgaatgtttt atgcattatt taagcctgtc tctattgttg gaatttcagg 1380
tcattttcat aaatattgtt gcaataaata tccttgaaca cacaaaaaaa aaaaaaaaa  1439
```

<210> 303

<211> 277

<212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beşeri Tümör nekroz faktörünün stimüle ettiği gen-6 (TSG-6) preprotein

<220>

<221> SİNYAL

<222> (1)...(17)

<223> sinyal dizisi

<300>

<308> UniProt: P98066.2

<309> 2014-07-09

<400> 303

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

<210> 304

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> olgun beşeri Tümör nekroz faktörünün stimüle ettiği gen-6 (TSG-6) protein

<400> 304

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

                85                  90                  95
Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr Cys Tyr Asn
            100                 105                 110
Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr Asp Pro Lys Gln Ile
        115                 120                 125
Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu Asp Asn Gln Ile Cys
    130                 135                 140
Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg Ile His Leu Ser Phe
145                 150                 155                 160
Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys Leu Ala Asp Tyr Val
                165                 170                 175
Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly Phe Val Gly Arg Tyr
            180                 185                 190
Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser Thr Gly Asn Val Met
        195                 200                 205
Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr Ala Gly Gly Phe Gln
    210                 215                 220
Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys Ser Ser Gln Gly Lys
225                 230                 235                 240
Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn Phe Leu Ala Gly Arg
                245                 250                 255
Phe Ser His Leu
            260
```

<210> 305

<211> 93

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TSG-6 Bağlantı sahası

<400> 305

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

<210> 306

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beşeri TSG-6 aa kalıntıları 35-129

<400> 306

```
Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys Leu Thr
 1               5                  10                  15
Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His Leu Ala
            20                  25                  30
Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His Val Cys
        35                  40                  45


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

<210> 307

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TSG-6 bağlantı sahası aa 36-129

<400> 307

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

<210> 308

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TSG-6 bağlantı sahası aa 36-132

<400> 308

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

<210> 309

<211> 93

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TSG-6 Bağlantı sahası varyantı K20A/K34A/K41A

<400> 309

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

<210> 310

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TSG-6 bağlantı sahası aa 35-129 varyant K21A/K35A/K42A

<400> 310

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

<210> 311

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IgG1 ağır zincir fragmanı

<400> 311

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

        115                 120                 125
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
    130                 135                 140
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
145                 150                 155                 160
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
                165                 170                 175
Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
            180                 185                 190
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
        195                 200                 205
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215                 220
```

<210> 312

<211> 349

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> TSG-6-LM-Fc füzyon proteini için peptit dizisi

<400> 312

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

305                 310                 315                 320
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
                325                 330                 335
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser
            340                 345
```

<210> 313

<211> 349

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> TSG-6-LM-Fc/deltaHep (protein)

<400> 313

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

<210> 314

<211> 1059

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> TSG-6-LM-Fc füzyon proteini - protein ekspresyonu için kullanılan kodonu optimize edilmiş DNA Dizisi

<400> 314

```
gctagcatgg acatgcgtgt gccagctcag ctgctgggac tgctgctgct gtggctgcct 60
ggagctagag gagcagatat cgcaggcgtg taccacaggg aggcacggtc cggaaagtac 120
aaactgacct atgctgaagc aaaggccgtg tgcgagttcg aaggcggaca cctggctaca 180
tataagcagc tggaggccgc tcgcaaaatc gggtttcacg tgtgcgcagc cggttggatg 240
gcaaaggggc gagtcggtta ccccattgtg aaaccaggcc ccaactgtgg cttcggaaag 300
actggcatca ttgactatgg aatcagactg aaccgcagcg agcgatgggg cgcatactgc 360
tataataccg gtgataagac tcacacctgc ccccttgtc ctgccccaga actgctgggg 420
ggtccttccg tgttcctgtt tccacccaag ccaaaagaca ccctgatgat ttctaggaca 480
cctgaggtca cttgcgtggt cgtggacgtg agtcacgaag atccagaagt caagtttaac 540
tggtacgtgg atggcgtcga agtgcataat gccaagacaa aacctcgtga ggaacagtac 600
aattctactt atagggtcgt gagtgtcctg accgtgctgc atcaggattg gctgaacggg 660
aaggagtata agtgcaaagt gtcaaataag gctctgccog cacctatcga gaaaacaatt 720
tccaaggcca aaggccagcc acgggaaccc caggtgtaca ctctgcctcc atccagagag 780
gaaatgacca aaaaccaggt cagcctgaca tgtctggtga aggggttcta tccaagcgac 840
atcgctgtgg agtgggaatc taatggtcag cccgagaaca attacaagac cacacccct 900
gtcctggact ccgatggcag cttctttctg tattcaaagc tgacagtgga taaatcccgc 960
tggcagcagg gaaacgtctt ctcctgtagc gtgatgcatg aggctctgca caatcattac 1020
actcagaagt ctctgagtct gtcaccaggg aaaggatcc                        1059
```

<210> 315

<211> 1059

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> TSG-6-LM-Fc/deltaHep (DNA)

<400> 315

```
gctagcatgg acatgcgtgt gccagctcag ctgctgggac tgctgctgct gtggctgcct 60
ggagctagag gagcagatat cgcaggcgtg taccacaggg aggcacggtc cggaaagtac 120
aaactgacct atgctgaagc agcggccgtg tgcgagttcg aaggcggaca cctggctaca 180
tatgcgcagc tggaggccgc tcgcgcaatc gggtttcacg tgtgcgcagc cggttggatg 240
gcaaaggggc gagtcggtta ccccattgtg aaaccaggcc ccaactgtgg cttcggaaag 300
actggcatca ttgactatgg aatcagactg aaccgcagcg agcgatgggg cgcatactgc 360
tataataccg gtgataagac tcacacctgc ccccttgtc ctgccccaga actgctgggg 420
ggtccttccg tgttcctgtt tccacccaag ccaaaagaca ccctgatgat ttctaggaca 480
cctgaggtca cttgcgtggt cgtggacgtg agtcacgaag atccagaagt caagtttaac 540
tggtacgtgg atggcgtcga agtgcataat gccaagacaa aacctcgtga ggaacagtac 600
aattctactt atagggtcgt gagtgtcctg accgtgctgc atcaggattg gctgaacggg 660
aaggagtata agtgcaaagt gtcaaataag gctctgccog cacctatcga gaaaacaatt 720
tccaaggcca aaggccagcc acgggaaccc caggtgtaca ctctgcctcc atccagagag 780
gaaatgacca aaaaccaggt cagcctgaca tgtctggtga aggggttcta tccaagcgac 840
atcgctgtgg agtgggaatc taatggtcag cccgagaaca attacaagac cacacccct 900
gtcctggact ccgatggcag cttctttctg tattcaaagc tgacagtgga taaatcccgc 960
tggcagcagg gaaacgtctt ctcctgtagc gtgatgcatg aggctctgca caatcattac 1020
actcagaagt ctctgagtct gtcaccaggg aaaggatcc                        1059
```

<210> 316

<211> 1059

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> TSG-6-LM-Fc füzyon proteinini kodlayan DNA

<400> 316

gctagcatgg acatgcgcgt acctgctcag ttgttggggc tcttgctgct gtggttgccc 60
ggggcacgtg gggcagatat cgccggtgtg taccacagag aagcacgggtc tggcaaatac 120
aagctcacct acgcagaagc taaggcggtg tgtgaatttg aaggcggcca tctcgcaact 180
tacaagcagc tagaggcagc cagaaaaatt ggatttcatg tctgtgctgc tggatggatg 240
gctaagggca gagttggata ccccattgtg aagccagggc ccaactgtgg atttggaaaa 300
actggcatta ttgattatgg aatcggtctc aataggagtg aaagatgggg tgcctattgc 360
tacaacaccg gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 420
ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 480
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 540
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 600
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 660
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 720
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag 780
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 840
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 900
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 960
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcacg aggctctgca caaccactac 1020
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggatcc 1059

<210> 317

<211> 1659

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HAS2 cDNA

<400> 317

atgcattgtg agaggtttct atgtatcctg agaataattg gaaccacact ctttggagtc 60
tctctcctcc ttggaatcac agctgcttat attgttggct accagtttat ccaaacggat 120
aattactatt tctcttttgg actgtatggt gccttttttgg catcacacct catcatccaa 180
agcctgtttg cctttttgga gcaccgaaaa atgaaaaaat ccctagaaac ccccataaag 240
ttgaacaaaa cagttgccct ttgcatcgct gcctatcaag aagatccaga ctacttaagg 300
aaatgtttgc aatctgtgaa aaggctaacc taccctggga ttaaagttgt catggtcata 360
gatgggaact cagaagatga cctttacatg atggacatct tcagtgaagt catgggcaga 420
gacaaatcag ccacttatat ctggaagaac aacttccacg aaaagggtcc cggtgagaca 480
gatgagtcac ataaagaaag ctcgcaacac gtaacgcaat tggtcttgtc caacaaaagt 540
atctgcatca tgcaaaaatg gggtggaaaa agagaagtca tgtacacagc cttcagagca 600
ctgggacgaa gtgtggatta tgtacaggtt tgtgattcag acactatgct tgaccagcgc 660
tcatctgtgg agatggtaaa agttttagaa gaagatccca tggttggagg tgttggggga 720
gatgtccaga ttttaaacaa gtacgattcc tggatctcat tcctcagcag tgtaagatat 780
tggatggctt ttaatatagg aagggcctgt cagtcttatt ttgggtgtgt tcagtgcatt 840
agtggacctc tgggaatgta cagaaactcc ttgttgcatg agtttgtgga agattggtac 900
aatcaagaat ttatgggcaa ccaatgtagc tttggtgatg acaggcatct cacgaaccgg 960
gtgctgagcc tgggctatgc aacaaaatac acagctcgat ctaagtgcct tactgaaaca 1020
cctatagaat atctcagatg gctaaaccag cagacccgtt ggagcaagtc ctacttccga 1080
gaatggctgt acaatgcaat gtggtttcac aaacatcact tgtggatgac ctacgaagcg 1140
attatcactg gattctttcc tttctttctc attgccacag taatccagct cttctaccgg 1200
ggtaaaattt ggaacattct cctcttcttg ttaactgtcc agctagtagg tctcataaaa 1260
tcatcttttg ccagctgcct tagaggaaat atcgtcatgg tcttcatgtc tctctactca 1320
gtgttatacа tgtcgagttt acttcccgcc aagatgtttg caattgcaac aataaacaaa 1380
gctgggtggg gcacatcagg aaggaaaacc attgttgtta atttcatagg actcattcca 1440
gtatcagttt ggtttacaat cctcctgggt ggtgtgattt tcaccattta taaggagtct 1500
aaaaggccat tttcagaatc caaacagaca gttctaattg ttggaacgtt gctctatgca 1560
tgctattggg tcatgctttt gacgctgtat gtagttctca tcaataagtg tggcaggcgg 1620
aagaagggac aacaatatga catggtgctt gatgtatga 1659

<210> 318

<211> 434

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> anti-PD-Ll antikoru ağır zinciri

<400> 318

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

<210> 319

<211> 213

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> anti-PD-Ll antikoru hafif zinciri

<400> 319

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

<210> 320

<211> 434

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> anti-PD-Ll antikoru ağır zinciri

<400> 320

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

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