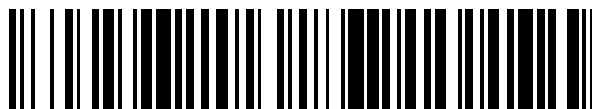


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 093**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47	(2006.01)	A61K 31/706	(2006.01)	C12N 9/26	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)	A61K 31/7068	(2006.01)		
A61K 9/107	(2006.01)	A61K 31/7076	(2006.01)		
A61K 9/127	(2006.01)	A61K 31/7088	(2006.01)		
A61K 9/50	(2006.01)	A61K 45/06	(2006.01)		
A61K 9/51	(2006.01)	A61K 47/56	(2007.01)		
A61K 31/337	(2006.01)	A61K 47/60	(2007.01)		
A61K 31/37	(2006.01)	A61K 47/64	(2007.01)		
A61K 31/42	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)		
A61K 31/573	(2006.01)	C12N 9/06	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013** **PCT/US2013/032684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013** **WO13151774**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 13715069 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** **EP 2833905**

54 Título: **Terapia combinada con hialuronidasa y un taxano dirigido a un tumor**

30 Prioridad:

04.04.2012 US 201261686429 P
16.10.2012 US 201261714719 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MANEVAL, DANIEL C.;
SHEPARD, H. MICHAEL y
THOMPSON, CURTIS B.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 673 093 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia combinada con hialuronidasa y un taxano dirigido a un tumor

5 Campo de la invención

En la presente memoria se proporciona una terapia combinada que contiene un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, y un taxano dirigido a un tumor, y opcionalmente un agente quimioterapéutico adicional tal como un análogo de nucleósido. La terapia combinada se puede utilizar en métodos para tratar cánceres, y en particular cánceres de tumores sólidos.

Antecedentes

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

Compendio

La presente invención proporciona una combinación de composiciones para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas, en donde la combinación comprende: una primera composición que comprende una hialuronidasa conjugada con un polímero; y una segunda composición que comprende un taxano dirigido a un tumor, en el que el taxano dirigido a un tumor comprende *nab*-paclitaxel o *nab*-docetaxel.

La invención proporciona adicionalmente una composición que comprende una hialuronidasa conjugada con un polímero para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas, en donde: la hialuronidasa se utiliza con un taxano dirigido a un tumor y se administra simultáneamente, casi simultáneamente, por separado o sucesivamente a un sujeto con el taxano dirigido a un tumor; y el taxano dirigido a un tumor comprende *nab*-paclitaxel o *nab*-docetaxel.

En la presente memoria se proporcionan combinaciones que contienen una composición que contiene un agente antihialuronano y una composición que contiene un taxano dirigido a un tumor. También se proporcionan en la presente memoria combinaciones que contienen una composición que contiene un agente antihialuronano, una composición que contiene un taxano dirigido a un tumor y una composición que contiene un análogo de nucleósido. Cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria puede contener adicionalmente una composición que contiene un corticosteroide. Se proporcionan en la presente memoria combinaciones o composiciones para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en donde se administran una composición que contiene un agente antihialuronano y una composición que contiene una formulación de taxano dirigido a un tumor. En algunos ejemplos, los métodos incluyen adicionalmente la administración de una composición que contiene un análogo de nucleósido. En algunos ejemplos, los métodos incluyen adicionalmente la administración de un corticosteroide. En otros ejemplos más, los métodos incluyen adicionalmente la administración de un tratamiento contra el cáncer. En tales combinaciones y métodos, los agentes se proporcionan en cantidades terapéuticamente eficaces como se describe en la presente memoria.

También se describen en la presente memoria los usos médicos de la terapia combinada. Por ejemplo, se describen en la presente memoria los usos de un agente antihialuronano y un taxano dirigido a un tumor para tratar el cáncer de páncreas, en donde el agente antihialuronano y el taxano dirigido a un tumor se formulan por separado o juntos. También se proporcionan en la presente memoria los usos de un agente antihialuronano para tratar el cáncer de páncreas, en donde dicho tratamiento incluye la administración simultánea, separada o sucesiva a un sujeto de un taxano dirigido a un tumor. También se proporcionan en la presente memoria composiciones que contienen un agente antihialuronano para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas, en donde dicho tratamiento incluye la administración simultánea, separada o sucesiva a un sujeto de un taxano dirigido a un tumor. En los ejemplos de los usos médicos en la presente memoria, el tratamiento también puede incluir la administración a un sujeto un análogo de nucleósido simultáneamente, por separado o sucesivamente con el agente antihialuronano o taxano dirigido a un tumor. En otros ejemplos o en ejemplos adicionales, el tratamiento puede incluir administrar un corticosteroide simultáneamente, por separado o sucesivamente con el agente antihialuronano.

En las combinaciones, composiciones y usos proporcionados en la presente memoria, el agente antihialuronano es una enzima de degradación de hialuronano o es un agente que inhibe la síntesis de hialuronano. En algunos ejemplos, el agente antihialuronano es una enzima de degradación de hialuronano que es una hialuronidasa. En otros ejemplos, el agente antihialuronano es una enzima de degradación de hialuronano que está conjugada con un polímero. En algunos ejemplos, el agente antihialuronano es un agente que inhibe la síntesis de hialuronano que se selecciona entre una molécula de ácido nucleico efectora o antisentido contra una HA sintasa o es un fármaco de molécula pequeña. En algunos ejemplos, el agente antihialuronano es un fármaco de molécula pequeña seleccionado entre 4-metilumbeliferona (MU) o un derivado de la misma, o leflunomida o un derivado de la misma. En otros ejemplos, el agente antihialuronano es un fármaco de molécula pequeña que es un derivado de 4-metilumbeliferona (MU) seleccionado entre 6,7-dihidroxi-4-metil cumarina o 5,7-dihidroxi-4-metil cumarina.

En la presente memoria se proporcionan combinaciones que contienen una composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano que está conjugada con un polímero y una composición que contiene un taxano dirigido a un tumor. También se proporcionan en la presente memoria combinaciones que contienen una composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano que está conjugada con un polímero, una composición que contiene un taxano dirigido a un tumor y una composición que contiene un análogo de nucleósido. Cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria puede contener adicionalmente una composición que contiene un corticosteroide. Se proporcionan en la presente memoria combinaciones o composiciones para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en donde se administran una composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano que está conjugada con un polímero y una composición que contiene una formulación de taxano dirigido a un tumor. En algunos ejemplos, los métodos incluyen adicionalmente la administración de una composición que contiene un análogo de nucleósido. En algunos ejemplos, los métodos incluyen adicionalmente la administración de un corticosteroide. En otros ejemplos más, los métodos incluyen adicionalmente la administración de un tratamiento contra el cáncer.

En la presente memoria se proporcionan combinaciones y usos que contienen una composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano, en donde la enzima de degradación de hialuronano está conjugada con un polímero; y una composición que contiene un taxano dirigido a un tumor. En algunos ejemplos de la combinación, las composiciones se formulan para administración directa, la concentración de enzima de degradación de hialuronano es suficiente para degradar hialuronano asociado a tumor, y la concentración de taxano dirigido a un tumor es suficiente para lograr el suministro intratumoral. En algunos ejemplos, la concentración de formulación de taxano dirigido a un tumor es suficiente para reducir los niveles de proteína de nucleósido desaminasa intratumoral o la actividad de proteína en comparación con los niveles o actividad de la nucleósido desaminasa en ausencia de la formulación de taxano intratumoral. En algunos ejemplos de las combinaciones, la enzima de degradación de hialuronano y el taxano dirigido a un tumor se co-formulan. En otros ejemplos de las combinaciones, la enzima de degradación de hialuronano y el taxano dirigido a un tumor se proporcionan por separado.

En cualquiera de los ejemplos, las combinaciones proporcionadas contienen adicionalmente una composición que contiene un análogo de nucleósido. En ejemplos particulares, la composición se formula para administración directa y la concentración de análogo de nucleósido es suficiente para lograr el suministro intratumoral. En algunos ejemplos de la combinación, el análogo de nucleósido se proporciona por separado de la enzima de degradación de hialuronano y del taxano dirigido a un tumor. En otros ejemplos de la combinación, el análogo de nucleósido se co-formula con la enzima de degradación de hialuronano o se co-formula con el taxano dirigido a un tumor. En otros ejemplos más de la combinación, el análogo de nucleósido se co-formula con la enzima de degradación de hialuronano y el taxano dirigido a un tumor.

En cualquiera de los ejemplos de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria, las composiciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano, composiciones que contienen un taxano dirigido a un tumor y/o composiciones que contienen un análogo de nucleósido se formulan para administración de dosificación múltiple. En otros ejemplos de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria, las composiciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano, composiciones que contienen un taxano dirigido a un tumor y/o composiciones que contienen un análogo de nucleósido se formulan para administración de una sola dosis.

En cualquiera de los ejemplos de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria, la composición enzimática de degradación de hialuronano contiene o está formulada para contener entre o aproximadamente entre 0,5 µg a 50 mg, 100 µg a 1 mg, 1 mg a 20 mg, 100 µg a 5 mg, 0,5 µg a 1.450 µg, 1 µg a 1.000 µg, 5 µg a 1.250 µg, 10 µg a 750 µg, 50 µg a 500 µg, 0,5 µg a 500 µg, 500 µg a 1.450 µg de enzima de degradación de hialuronano conjugado con un polímero. En otros ejemplos de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero tiene una actividad específica de al menos o aproximadamente 20.000 U/mg, 25.000 U/mg, 30.000 U/mg, 31.000 U/mg, 32.000 U/mg, 33.000 U/mg, 34.000 U/mg, 35.000 U/mg, 36.000 U/mg, 37.000 U/mg, 38.000 U/mg, 39.000 U/mg, 40.000 U/mg, 45.000 U/mg, 50.000 U/mg, 55.000 U/mg, 60.000 U/mg o más. En otros ejemplos de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria, la composición enzimática de degradación de hialuronano contiene entre o

aproximadamente entre 150 unidades (U) a 60.000 U, 300 U a 30.000 U, 500 U a 25.000 U, 500 U a 10.000 U, 150 U a 15.000 U, 150 U a 5.000 U, 500 U a 1.000 U, 5.000 U a 45.000 U 10.000 U a 50.000 U o 20.000 U a 60.000 U de enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero. El volumen de la composición que contiene la enzima de degradación de hialuronano puede estar entre o puede estar aproximadamente entre 0,5 mL a 100 mL, 0,5 mL a 50 mL, 0,5 mL a 10 mL, 1 mL a 40 mL, 1 mL a 20 mL, 1 mL a 10 mL o 3 mL a 10 mL. En algunos ejemplos de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria, la composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano contiene histidina y/o NaCl. En otros ejemplos, la composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano tiene un pH que está entre o aproximadamente entre 6,0 y 7,4.

En cualquiera de los ejemplos de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa. Por ejemplo, la hialuronidasa puede ser una PH20 o una forma truncada de la misma que carece de un sitio de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal o una porción del sitio de anclaje de GPI. En algunos ejemplos, la hialuronidasa es una PH20 que es una PH20 humana o no humana. En un ejemplo específico, la enzima de degradación de hialuronano es una PH20 truncada y la PH20 truncada contiene una secuencia de aminoácidos que contiene los aminoácidos 36-464 de SEC ID NO: 1, o contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36 - 464 de SEC ID NO: 1 y conserva la actividad hialuronidasa. En algunos ejemplos, la hialuronidasa es PH20 que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de SEC ID NO: 1 y conserva la actividad hialuronidasa.

En cualquiera de los ejemplos de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria, la PH20 contiene una secuencia de aminoácidos que contiene un truncamiento C-terminal después de la posición de aminoácido 465, 466, 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 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, o es una variante de la misma que exhibe al menos un 85% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que contiene un truncamiento C-terminal después de la posición de aminoácido 465, 466, 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 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 y conserva la actividad hialuronidasa. Por ejemplo, la PH20 contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% , 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que contiene un truncamiento C-terminal después de la posición de aminoácidos 465, 466, 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 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y conserva la actividad hialuronidasa.

En cualquiera de los ejemplos de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria, el taxano dirigido a un tumor es paclitaxel o docetaxel. El taxano dirigido a un tumor se puede conectar directa o indirectamente a un radical de direccionamiento tumoral. En algunos ejemplos, el taxano dirigido a un tumor se formula como un vehículo de suministro seleccionado entre una micela, nanopartícula, microesfera, liposomas o hidrogel. El vehículo de suministro se puede conectar unir directa o indirectamente a un radical de direccionamiento tumoral. En algunos ejemplos, el radical de direccionamiento tumoral se selecciona entre una macromolécula, una proteína, un péptido, un anticuerpo monoclonal o un lípido de ácido graso. En otros ejemplos, el radical de direccionamiento tumoral es un anticuerpo monoclonal seleccionado entre cetuximab o trastuzumab. En otros ejemplos más, el radical de direccionamiento tumoral es albúmina. De acuerdo con las presentes reivindicaciones, el taxano dirigido a un tumor es paclitaxel unido a albúmina o docetaxel unido a albúmina.

En cualquiera de los ejemplos de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria, la composición de taxano dirigido a un tumor contiene o está formulada para contener entre o aproximadamente entre 10 mg y 1.000 mg, tal como 20 mg y 500 mg, 10 mg y 250 mg, 75 mg y 400 mg, 100 mg y 200 mg, 150 mg y 400 mg, 200 mg y 800 mg, 50 mg y 200 mg o 50 mg y 150 mg de taxano dirigido a un tumor. En otros ejemplos, el volumen de la composición que contiene un taxano dirigido a un tumor está entre o aproximadamente entre 0,5 mL y 100 mL, 1 mL y 500 mL, 0,5 mL y 50 mL, 0,5 mL y 10 mL, 1 mL y 40 mL, 1 mL y 20 mL, 1 mL y 10 mL o 3 mL y 10 mL.

En cualquiera de los ejemplos de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria, el análogo de nucleósido es un análogo de purina o pirimidina o sus derivados. En algunos ejemplos, el análogo de nucleósido se selecciona entre fluoropirimidina, 5-fluorouracilo, 5-fluoro-2'-desoxicitidina, citarabina, gemcitabina, troxacitabina, decitabina, Azacitidina, pseudoisocianidina, Zebularina, Ancitabina, Fazarabina, 6-azacitidina, capecitabina, N⁴-octadecil-citarabina, ácido eláidico citarabina, fludarabina, cladribina, clofarabina, nelarabina, forodesina y pentostatina, o sus derivados. En un ejemplo, el análogo de nucleósido es un sustrato para una nucleósido desaminasa que es adenosina desaminasa o citidina desaminasa. En algunos ejemplos, el análogo de nucleósido se selecciona entre fludarabina, citarabina, gemcitabina, decitabina y azacitidina o sus derivados.

En cualquiera de los ejemplos de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria, la composición del análogo de nucleósido contiene o está formulada para contener de 100 mg a 5.000 mg, de 500 mg a 5.000 mg, de 500 mg a 2.500 mg, de 1.000 mg a 2.500 mg, 1.500 mg a 2.500 mg o 2.000 mg a 5.000 mg de un análogo de nucleósido. En otros ejemplos, el volumen de la composición que contiene un análogo de nucleósido está entre o aproximadamente entre 0,5 mL y 1.000 mL, tal como 0,5 mL y 100 mL, 0,5 mL y 10 mL, 1 mL y 500 mL, 1 mL y 10 mL.

Cualquiera de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria puede contener adicionalmente una composición que contiene un corticosteroide. En algunos ejemplos, el corticosteroide es un glucocorticoide que se selecciona entre cortisonas, dexametasonas, hidrocortisonas, metilprednisolonas, prednisolonas y prednisonas. En algunos ejemplos, la composición de corticosteroides contiene o está formulada para contener entre o aproximadamente entre 0,1 y 20 mg, 0,1 y 15 mg, 0,1 y 10 mg, 0,1 y 5 mg, 0,2 y 20 mg, 0,2 y 15 mg, 0,2 y 10 mg, 0,2 y 5 mg, 0,4 y 20 mg, 0,4 y 15 mg, 0,4 y 10 mg, 0,4 y 5 mg, 0,4 y 4 mg, 1 y 20 mg, 1 y 15 mg o 1 y 10 mg de corticosteroide.

En cualquiera de los ejemplos de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria, las composiciones se formulan para administración oral, intravenosa (IV), subcutánea, intramuscular, intratumoral, intradérmica, tópica, transdérmica, rectal, intratecal o subepidérmica. Por ejemplo, las composiciones se formulan para administración intravenosa o administración subcutánea.

En cualquiera de los ejemplos de las combinaciones, métodos y usos descritos en la presente memoria, el polímero es un polialquilenglicol, dextrano, pululano o celulosa. En un ejemplo, el polímero es un polialquilenglicol que se selecciona entre polietilenglicoles (PEG) o metoxipolietilenglicoles (mPEG). En un ejemplo específico, el polímero es un PEG, y el PEG es un PEG ramificado o lineal. En algunos ejemplos, el polímero se produce por reacción con metoxi-poli(etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (5 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (20 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (30 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)- α -metilbutanoato de succinimidilo (mPEG-SMB) (20 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)- α -metilbutanoato de succinimidilo (mPEG-SMB) (30 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butiraldehído (mPEG-butiraldehído) (30 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-propionato de succinimidilo (mPEG-SPA) (20 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-propionato de succinimidilo (mPEG-SPA) (30 kDa); (metoxi-poli(etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (10 kDa ramificado); (metoxi-poli(etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (20 kDa ramificado); (metoxi-poli(etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (40 kDa ramificado); (metoxi-poli(etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (60 kDa ramificado); biotina-poli(etilenglicol)-éster de N-hidroxisuccinimida (biotina-PEG-NHS) (5 kDa biotinilado); poli(etilenglicol)-carbonato de p-nitrofenilo (PEG-carbonato de p-nitrofenilo) (30 kDa); o poli(etilenglicol)-propionaldehído (PEG-propionaldehído) (30 kDa). En ejemplos específicos, el polímero es un PEG que tiene un peso molecular de 30 o aproximadamente 30 kilodaltons.

Cualquiera de las combinaciones proporcionadas en la presente memoria se puede empaquetar como un kit y opcionalmente incluir instrucciones de uso.

También se proporcionan en la presente memoria combinaciones o composiciones para utilizar en el tratamiento de cáncer de páncreas en donde se administra una composición que contiene una enzima de degradación de hialuronano, en donde la enzima de degradación de hialuronano se conjuga con un polímero y se administra una composición que contiene una formulación de taxano dirigido a un tumor. En cualquiera de los ejemplos del método, también se administra una composición que contiene un análogo de nucleósido.

En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, el cáncer es un tumor. En un ejemplo, el tumor es un tumor sólido. En cualquiera de los ejemplos del método o usos de la presente memoria, el tumor presenta un aumento de expresión celular y/o estromal de un hialuronano, en comparación con un tejido no canceroso del mismo tipo de tejido o en comparación con un tumor no metastásico del mismo tipo de tumor. En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, el cáncer se selecciona entre cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de mama. De acuerdo con las presentes reivindicaciones, el cáncer es cáncer de páncreas.

En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano es una hialuronidasa. Por ejemplo, la hialuronidasa es una PH20 o forma truncada de la misma que carece de un sitio de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal o una porción del sitio de unión de GPI. En un ejemplo específico, la hialuronidasa es una PH20 que es una PH20 humana o no humana. En un ejemplo particular, la enzima de degradación de hialuronano es una PH20 truncada y la PH20 truncada contiene una secuencia de aminoácidos que contiene los aminoácidos 36-464 de SEC ID NO: 1, o contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36 - 464 de SEC ID NO: 1 y conserva la actividad hialuronidasa. En algunos ejemplos, la PH20 contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97 %, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de SEC ID NO: 1 y conserva la actividad hialuronidasa. En otros ejemplos, la PH20 contiene una secuencia de aminoácidos que contiene un truncamiento C-terminal después de la posición de aminoácido 465, 466, 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 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, o es una variante de la misma que exhibe al menos 85% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que contiene un truncamiento C-terminal después de la posición de aminoácido 465, 466, 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 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 y conserva la actividad hialuronidasa. En otros ejemplos más, la PH20 contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que contiene un truncamiento C-terminal después de la posición de aminoácido 465, 466, 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 o 500 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 y conserva la actividad hialuronidasa.

En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, el polímero es un polialquilenglicol, dextrano, pululano o celulosa. En un ejemplo, el polímero es un polialquilenglicol que se selecciona entre polietilenglicoles (PEG) o metoxipolietilenglicoles (mPEG). En un ejemplo específico, el polímero es un PEG, y el PEG es un PEG ramificado o lineal. En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos proporcionados en la presente memoria, el polímero se produce por reacción con metoxi-poli(etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (5 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (20 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butanoato de succinimidilo (mPEG-SBA) (30 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)- α -metilbutanoato de succinimidilo (mPEG-SMB) (20 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)- α -metilbutanoato de succinimidilo (mPEG-SMB) (30 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-butiraldehído (mPEG-butiraldehído) (30 kDa), metoxi-poli(etilenglicol)-propionato de succinimidilo (mPEG-SPA) (20 kDa); metoxi-poli(etilenglicol)-propionato de succinimidilo (mPEG-SPA) (30 kDa); (metoxi-poli(etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (10 kDa ramificado); (metoxi-poli(etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (20 kDa ramificado); (metoxi-poli(etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (40 kDa ramificado); (metoxi-poli(etilenglicol))₂-éster de N-hidroxisuccinimida (mPEG₂-NHS) (60 kDa ramificado); biotina-poli(etilenglicol)- éster de N-hidroxisuccinimida (biotina-PEG-NHS) (5 kDa biotinilado); poli(etilenglicol)-carbonato de p-nitrofenilo (PEG-carbonato de p-nitrofenilo) (30 kDa); o poli(etilenglicol)-propionaldehído (PEG-propionaldehído) (30 kDa). En un ejemplo específico, el polímero es un PEG que tiene un peso molecular de 30 o aproximadamente 30 kilodaltons.

En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano se administra o se formula para su administración en una cantidad de intervalo de dosificación de entre o aproximadamente entre aproximadamente 0,01 μ g/kg a 25 mg/kg (del sujeto), 0,5 μ g/kg y 25 mg/kg, 0,5 μ g/kg y 10 mg/kg, 0,02 mg/kg y 1,5 mg/kg, 0,01 μ g/kg y 15 μ g/kg, 0,05 μ g/kg y 10 μ g/kg , 0,75 μ g/kg y 7,5 μ g/kg o 1,0 μ g/kg y 3,0 μ g/kg (del sujeto). En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos proporcionados en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano se administra o se formula para administración en una cantidad de intervalo de dosificación de entre aproximadamente 1 Unidad/kg y 800.000 Unidades/kg (del sujeto), tal como entre 10 y 800.000 Unidades/kg, 10 y 750.000 Unidades/kg, 10 y 700.000 Unidades/kg, 10 y 650.000 Unidades/kg, 10 y 600.000 Unidades/kg, 10 y 550.000 Unidades/kg, 10 y 500.000 Unidades/kg, 10 y 450.000 Unidades/kg, 10 y 400.000 Unidades/kg, 10 y 350.000 Unidades/kg, 10 y 320.000 Unidades/kg, 10 y 300.000 Unidades/kg, 10 y 280.000 Unidades/kg, 10 y 260.000 Unidades/kg, 10 y 240.000 Unidades/kg, 10 y 220.000 Unidades/kg, 10 y 200.000 Unidades/kg, 10 y 180.000 Unidades/kg, 10 y 160.000 Unidades/kg, 10 y 140.000 Unidades/kg, 10 y 120.000 Unidades/kg, 10 y 100.000 Unidades/kg, 10 y 80.000 Unidades/kg, 10 y 70.000 Unidades/kg, 10 y 60.000 Unidades/kg, 10 y 50.000 Unidades/kg, 10 y 40.000 Unidades/kg, 10 y 30.000 Unidades/kg, 10 y 20.000 Unidades/kg, 10 y 15.000 Unidades/kg, 10 y 12.800 Unidades/kg, 10 y 10.000 Unidades/kg, 10 y 9.000 Unidades/kg, 10 y 8.000 Unidades/kg, 10 y 7.000 Unidades/kg, 10 y 6.000 Unidades/kg, 10 y 5.000 Unidades/kg, 10 y 4.000 Unidades/kg, 10 y 3.000 Unidades/kg, 10 y 2.000 Unidades/kg, 10 y 1.000 Unidades/kg, de 10 y 900 Unidades/kg, 10 y 800 Unidades/kg, 10 y 700 Unidades/kg, 10 y 500 Unidades/kg, 10 y 400 Unidades/kg, 10 y 300 Unidades/kg, 10 y 200 Unidades/kg, 10 y 100 Unidades/kg, 16 y 600.000 Unidades/kg, 16 y 500.000 Unidades/kg, 16 y 400.000 Unidades/kg, 16 y 350.000 Unidades/kg, 16 y 320.000 Unidades/kg, 16 y 160.000 Unidades/kg, 16 y 80.000 Unidades/kg, 16 y 40.000 Unidades/kg, 16 y 20.000 Unidades/kg, 16 y 16.000 Unidades/kg, 16 y 12.800 Unidades/kg , 16 y 10.000 Unidades/kg, 16 y 5.000 Unidades/kg, 16 y 4.000 Unidades/kg, 16 y 3.000 Unidades/kg, 16 y 2.000 Unidades/kg, 16 y 1.000 Unidades/kg, 16 y 900 Unidades/kg, 16 y 800 Unidades/kg, 16 y 700 Unidades/kg, 16 y 500 Unidades/kg, 16 y 400 Unidades/kg, 16 y 300 Unidades/kg, 16 y 200 Unidades/kg, 16 y 100 Unidades/kg, 160 y 12.800 Unidades/kg, 160 y 8.000 Unidades/kg, 160 y 6.000 Unidades/kg, 160 y 4.000 Unidades/kg, 160 y 2.000 Unidades/kg, 160 y 1.000 Unidades/kg, 160 y 500 Unidades/kg, 500 y 5.000 Unidades/kg, 1.000 y 100.000 Unidades/kg o 1.000 y 10.000 Unidades/kg (del sujeto).

En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, el taxano dirigido a un tumor es paclitaxel o docetaxel. El taxano dirigido a un tumor se puede unir directa o indirectamente a un radical de

direccionamiento tumoral. En algunos ejemplos, el taxano dirigido a un tumor se formula como un vehículo de suministro seleccionado de entre una micela, nanopartícula, microesfera, liposomas o hidrogel. El vehículo de suministro se puede unir directa o indirectamente a un radical de direccionamiento tumoral. En algunos ejemplos, el radical de direccionamiento tumoral se selecciona entre una macromolécula, una proteína, un péptido, un anticuerpo monoclonal o un lípido de ácido graso. En otros ejemplos, el radical de direccionamiento tumoral es un anticuerpo monoclonal seleccionado entre cetuximab o trastuzumab. De acuerdo con las presentes reivindicaciones, el radical de direccionamiento tumoral es albúmina. El taxano dirigido a un tumor es paclitaxel unido a albúmina o docetaxel unido a albúmina. En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos proporcionados en la presente memoria, el taxano dirigido a un tumor se administra o se formula para la administración en un intervalo de dosificación que está entre o aproximadamente entre 1 mg/m² y 1.000 mg/m² (área de superficie corporal del sujeto), 10 mg/m² y 500 mg/m², 50 mg/m² y 400 mg/m², o 25 mg/m² y 300 mg/m².

En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, el análogo de nucleósido es un análogo de purina o pirimidina o sus derivados. En cualquiera de los ejemplos, el análogo de nucleósido se selecciona entre fluoropirimidina 5-fluorouracilo, 5-fluoro-2'-desoxicitidina, citarabina, gemcitabina, troxacitabina, decitabina, Azacitidina, pseudosocianidina, Zebularina, Ancitabina, Fazarabina, 6-azacitidina, capecitabina, N⁴-octadecil-citarabina, ácido eláidico citarabina, fludarabina, cladribina, clofarabina, nelarabina, forodesina y pentostatina, o sus derivados. En un ejemplo concreto, el análogo de nucleósido es un sustrato para una nucleósido desaminasa y la nucleósido desaminasa es adenosina desaminasa o citidina desaminasa. En los ejemplos, el análogo de nucleósido se selecciona entre fludarabina, citarabina, gemcitabina, decitabina y azacitidina o derivados de las mismas. En otros ejemplos más, el análogo de nucleósido es gemcitabina o un derivado de la misma. En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos proporcionados en la presente memoria, el análogo de nucleósido se administra o se formula para administración en un intervalo de dosificación que está entre o entre aproximadamente 100 mg/m² y 2.500 mg/m², 500 mg/m² y 2.000 mg/m², 750 mg/m² y 1.500 mg/m², 1.000 mg/m² y 1500 mg/m², o 500 mg/m² y 1.500 mg/m². En otros ejemplos de los métodos o usos proporcionados en la presente memoria, el análogo de nucleósido se administra o se formula para administración en una cantidad que es al menos o al menos aproximadamente 200 mg/m² o 500 mg/m² pero que es menos de 1.000 mg/m² o 1.250 mg/m².

En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, las composiciones se administran o se formulan para administración oral, intravenosa (IV), subcutánea, intramuscular, intratumoral, intradérmica, tópica, transdérmica, rectal, intratecal o sub-epidérmica. En un ejemplo concreto, las composiciones se administran por vía intravenosa o subcutánea. En cualquiera de los métodos o usos en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano se administra o se utiliza antes, simultáneamente o casi simultáneamente, sucesiva o intermitentemente con el taxano dirigido a un tumor.

En ejemplos de los métodos descritos en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano se administra antes de la administración del taxano dirigido a un tumor. En un ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano se administra al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas antes de la administración del taxano dirigido a un tumor. En otro ejemplo de los métodos proporcionados en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano y el taxano dirigido a un tumor se administran simultáneamente o casi simultáneamente.

En cualquiera de los ejemplos de los métodos descritos en la presente memoria, la frecuencia de administración de la enzima de degradación de hialuronano es dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada 14 días, una vez cada 21 días o una vez al mes. En otros ejemplos, la frecuencia de administración del taxano dirigido a un tumor es dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada 14 días, una vez cada 21 días o una vez al mes. En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos proporcionados en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano y/o el taxano dirigido a un tumor se administran o se formulan para administración antes, simultáneamente o casi simultáneamente, sucesivamente o intermitentemente con el análogo de nucleósido.

En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano y el taxano dirigido a un tumor se administran durante un número predeterminado de semanas en un ciclo de administración. En un ejemplo, el número predeterminado de semanas puede ser de al menos dos semanas, al menos tres semanas o al menos cuatro semanas. En algunos ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano se administra al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas antes de la administración del análogo de nucleósido. En algunos ejemplos, el taxano dirigido a un tumor se administra al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas o 24 horas antes de la administración del análogo de nucleósido. En un ejemplo concreto, el taxano dirigido a un tumor se administra simultáneamente o casi simultáneamente con el análogo de nucleósido. En los métodos proporcionados, la frecuencia de administración del análogo de nucleósido puede ser dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada 14 días, una vez cada 21 días o una vez al mes. En algunos ejemplos, el análogo de nucleósido se

administra durante un número predeterminado de semanas en un ciclo de administración. Por ejemplo, el número predeterminado de semanas puede ser de al menos dos semanas, al menos tres semanas o al menos cuatro semanas. En otro ejemplo de los métodos proporcionados en la presente memoria, después del número predeterminado de semanas de administración del análogo de nucleósido, la administración se interrumpe durante un primer período de tiempo predeterminado, y a continuación se reanuda durante al menos una semana.

En ejemplos concretos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, la enzima de degradación de hialuronano y el taxano dirigido a un tumor se administran antes de la administración del análogo de nucleósido; se administran simultáneamente o casi simultáneamente; y se administran a una frecuencia de administración de dos veces por semana o una vez por semana durante un número predeterminado de semanas. En algunos ejemplos, el número predeterminado de semanas es de cuatro semanas. En tales ejemplos, el análogo de nucleósido se administra al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano y del taxano dirigido a un tumor.

En cualquiera de los ejemplos de los métodos o usos descritos en la presente memoria, el análogo de nucleósido se administra una vez a la semana durante un número predeterminado de semanas. En un ejemplo, el número predeterminado de semanas es de tres semanas. En tales ejemplos, la administración puede suspenderse durante al menos una semana.

En cualquiera de los métodos o usos descritos en la presente memoria, el ciclo de administración y/o interrupción de la administración puede repetirse una pluralidad de veces. En algunos ejemplos, la frecuencia de administración en el primer ciclo de administración es la misma que la frecuencia de administración en ciclos de administración posteriores. Por ejemplo, la frecuencia de administración es dos veces a la semana en el primer ciclo de administración y una vez a la semana en ciclos posteriores de administración.

Cualquiera de los métodos o usos descritos en la presente memoria puede incluir adicionalmente una etapa de administración de un corticosteroide o un tratamiento que incluye la administración de un corticosteroide. En cualquiera de estos ejemplos, el corticosteroide es un glucocorticoide que puede seleccionarse entre cortisonas, dexametasonas, hidrocortisonas, metilprednisolonas, prednisolonas y prednisonas. En algunos ejemplos del método, el corticosteroide se administra antes, junto con, intermitentemente o después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano. En un ejemplo, el corticosteroide se co-administra con la enzima de degradación de hialuronano. En otro ejemplo, el corticosteroide se administra al menos o aproximadamente al menos 1 hora antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano. En otro ejemplo de los métodos proporcionados, el corticosteroide se administra al menos de 8 horas a 12 horas después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano. En algunos ejemplos, la cantidad de corticosteroide administrada es o está formulada para la administración entre 0,1 y 20 mg, 0,1 a 15 mg, 0,1 y 10 mg, 0,1 y 5 mg, 0,2 y 20 mg, 0,2 y 15 mg., 0,2 y 10 mg, 0,2 y 5 mg, 0,4 y 20 mg, 0,4 y 15 mg, 0,4 y 10 mg, 0,4 y 5 mg, 0,4 y 4 mg, 1 y 20 mg, 1 y 15 mg o 1 y 10 mg. El corticosteroide se puede administrar por vía oral.

Cualquiera de los métodos o usos descritos en la presente memoria puede incluir adicionalmente la administración de un tratamiento contra el cáncer. En algunos ejemplos, el tratamiento contra el cáncer se selecciona entre cirugía, radiación, un agente quimioterapéutico, un agente biológico, un polipéptido, un anticuerpo, un péptido, una molécula pequeña, un vector de terapia génica, un virus y ADN. Cualquiera de las combinaciones y composiciones proporcionadas en la presente memoria se puede utilizar para tratar a un sujeto que es un ser humano.

También se proporcionan en la presente memoria combinaciones de composiciones para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas. Cualquiera de las combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente memoria se puede utilizar para tratar el cáncer. En algunos ejemplos, el cáncer es un tumor. Por ejemplo, el cáncer es un tumor sólido. En algunos ejemplos, el tumor presenta un aumento de la expresión celular y/o estromal de un hialuronano, en comparación con un tejido no canceroso del mismo tipo de tejido o en comparación con un tumor no metastásico del mismo tipo de tumor. En algunos ejemplos, el cáncer se selecciona entre cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de mama. De acuerdo con las presentes reivindicaciones, el cáncer es cáncer de páncreas. También se describe en la presente memoria el uso de una combinación que contiene una enzima de degradación de hialuronano conjugada con un polímero y una composición que contiene un taxano dirigido a un tumor para aumentar la actividad intratumoral de un análogo de nucleósido.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** representa el efecto de PEGPH20 (P) y/o nab-paclitaxel (NAB, N) sobre el crecimiento del tumor en un modelo de xenoinjerto de tumor PDA en BxPC-3 de ratón.

La **Figura 2** describe los efectos de la administración de dosis variables de gemcitabina (GEM) sobre el

crecimiento del tumor en un modelo de xenoinjerto de tumor PDA en BxPC-3 de ratón.

La **Figura 3** representa el efecto de PEGPH20 (P), gemcitabina (GEM, G) y/o nab-paclitaxel (NAB, N) sobre el crecimiento del tumor en un modelo de xenoinjerto de tumor PDA en BxPC-3 de ratón.

La **Figura 4** representa la mediana del tiempo de supervivencia de los ratones tratados con PEGPH20 (P), gemcitabina (GEM, G) y/o nab-paclitaxel (NAB, N) en un modelo de xenoinjerto de tumor PDA en BxPC-3 de ratón.

La **Figura 5** representa los niveles de CA19-9 (Figura 5A) y marcador CEA (Figura 5B) del suero de ratones tratados con PEGPH20 (P), gemcitabina (GEM, G) y/o nab-paclitaxel (NAB, N) en un modelo de xenoinjerto de tumor ratón PDA en BxPC-3.

La **Figura 6** representa la inhibición del crecimiento tumoral de PEGPH20 y paclitaxel conjugado con albúmina (Ab-pac) en un modelo de xenoinjerto. La Figura 6A representa la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con vehículo, paclitaxel conjugado con albúmina (Ab-pac), PEGPH20, o Ab-pac y PEGPH20 en el modelo tumoral MDA-MB-468/HAS3. La Figura 6B representa la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con vehículo, paclitaxel conjugado con albúmina (Ab-pac) a 1 mg/kg, Ab-pac a 3 mg/kg, Ab-pac a 1 mg/kg y PEGPH20, o Ab-pac a 10 mg/kg en el modelo de tumor MDA-MB-468/HAS3.

Descripción detallada

Esquema

A. Definiciones

B. Terapia combinada con agente anti-hialuronano

1. Tumores sólidos y terapias dirigidas contra tumores

- a. Taxano dirigido a un tumor
- b. Agente anti-hialuronano

2. Terapia combinada con agente anti-hialuronano y taxano dirigido a un tumor

C. Agentes de terapia combinada

1. Agentes anti-hialuronano

- a. Agentes que inhiben la síntesis de hialuronano
- b. Enzimas de degradación de hialuronano y enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímero

i. Hialuronidasas

- (a) Hialuronidasas PH20 de tipo mamífero
- (b) Hialuronidasa bacteriana
- (c) Hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos

ii. Otras enzimas de degradación de hialuronano

iii. Enzimas de degradación de hialuronano solubles

- (a) PH20 humana soluble
- (b) rHuPH20

iv. Glicosilación de enzimas de degradación de hialuronano

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

enzimas de degradación de hialuronano solubles PEGiladas

2. Taxanos y formulaciones de los mismos

- a. Taxanos
- b. Taxanos dirigidos a un tumor o al estroma. Taxano unido a albúmina

3. Agente quimioterapéutico adicional (p.ej., análogo de nucleósido) Análogos de nucleósidos ilustrativos

- i. Gemcitabina
- ii. Citarabina

- ii. Decitabina
- iv. Azacitidina

5	D. Métodos de producción de ácidos nucleicos y polipéptidos codificados de enzimas de degradación de hialuronano
	1. Vectores y Células
	2. Expresión
10	a. Células procariotas
	b. Células de levadura
	c. Células de insecto
	d. Células de mamíferos
15	e. Plantas
	3. Técnicas de purificación
	4. PEGilación de polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano
20	E. Composiciones y formulaciones farmacéuticas
	1. Formulaciones
	a. Inyectables, soluciones y emulsiones
25	b. Polvos liofilizados
	c. Administración tópica
	d. Composiciones para otras vías de administración
	2. Cantidades de formulación
30	3. Envasado y artículos de fabricación
	F. Métodos para evaluar la actividad, la biodisponibilidad y la farmacocinética
	1. Ensayos <i>in vitro</i>
35	a. Actividad de hialuronidasa de una enzima de degradación de hialuronano
	b. Actividad de taxano
	c. Actividad anticancerosa
40	2. Modelos animales <i>in vivo</i>
	3. Farmacocinética y tolerabilidad
	G. Métodos y usos de la terapia combinada
45	1. Cánceres
	Selección de sujetos para el tratamiento
	2. Dosificación y administración
50	3. Régimen de dosificación: frecuencia y ciclo de administración
	4. Terapia combinada adicional
	a. Corticosteroide
	b. Agentes anticancerosos y otros tratamientos
55	H. Ejemplos

A. Definiciones

60 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenecen la invención o invenciones. En el caso en el que haya una pluralidad de definiciones para los términos en la presente memoria, prevalecerán las de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de este tipo, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y que la información particular en Internet puede aparecer y desaparecer, pero se puede encontrar información equivalente buscando en Internet. La referencia a esto evidencia

la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

Según se utiliza en la presente memoria, "terapia combinada" se refiere a un tratamiento en el que un sujeto recibe dos o más agentes terapéuticos, tales como al menos dos o al menos tres agentes terapéuticos, para tratar una sola enfermedad. Para los fines de la presente memoria, la terapia combinada incluye terapia con una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y un taxano dirigido a un tumor y opcionalmente un agente anticanceroso o agente quimioterapéutico adicionales tales como un análogo de nucleósido.

Según se utiliza en la presente memoria, un taxano se refiere a una familia de agentes antimitóticos o antimicrotúbulos que inhiben el crecimiento celular al detener la mitosis y la división celular debido a la interferencia en la polimerización de microtúbulos. Los taxanos incluyen diterpenos producidos naturalmente a partir de las plantas del género *Taxus* (tejos). Los taxanos también incluyen taxanos que se producen sintéticamente que exhiben actividad antimitótica o antimicrotúbulos. Típicamente, los taxanos comparten una estructura central común que contiene cuatro anillos (anillos A y C de seis miembros, anillo B de ocho miembros y anillo D de cuatro miembros). Un ejemplo de un taxano es paclitaxel, taxano o un derivado o análogo de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, la actividad antimitótica se refiere a inhibir, reducir o prevenir la mitosis. En virtud de tal actividad, el crecimiento celular se inhibe, se reduce o se previene. Por ejemplo, un agente exhibe actividad antimitótica si el crecimiento celular se inhibe en al menos o aproximadamente al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con el crecimiento celular en ausencia del agente.

Según se utiliza en la presente memoria, la actividad antimicrotúbulos se refiere a la actividad de cualquier agente que interfiera con los microtúbulos, por ejemplo disminuyendo, reduciendo o previniendo la polimerización de microtúbulos. Por lo tanto, la actividad antimicrotúbulos puede referirse a cualquier actividad que establezca los microtúbulos, que son naturalmente inestables y que se someten a procesos dinámicos de despolimerización (acortamiento) y polimerización (alargamiento). Por ejemplo, la actividad antimicrotúbulos se efectúa mediante agentes, tales como taxanos, que interactúan con los extremos de los microtúbulos, congelando de ese modo o previniendo el desensamblaje o el ensamblaje. Los ensayos para evaluar la polimerización de microtúbulos son conocidos en la técnica, y los ensayos ilustrativos se describen en la presente memoria. Existe actividad antimicrotúbulos si un agente inhibe la polimerización de microtúbulos en al menos o aproximadamente al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con la polimerización en ausencia del agente.

Según se utiliza en la presente memoria, un "taxano dirigido a un tumor" se refiere a taxano que está vinculado, directa o indirectamente, a un radical y que exhibe aumento de especificidad con una o más moléculas en la superficie de un tumor en comparación con el taxano que no está relacionado con el radical tumoral. Por ejemplo, el radical puede ser una macromolécula, péptido, proteína, anticuerpo (p.ej. anticuerpo monoclonal) o lípido que interactúa o se une (p.ej. se une específicamente) a una molécula presente en la superficie de un tumor tal como un azúcar, lípido, glicosaminoglicano o proteína presente en la superficie del tumor. Generalmente, la molécula que está presente en la superficie del tumor está presente a un nivel o en una medida que es aberrante o distinta de los tejidos no tumorales o tejidos o células normales.

Según se utiliza en la presente memoria, la frase "suficiente para lograr el suministro intratumoral" significa que el taxano exhibe un aumento de direccionamiento o un direccionamiento mayor a una célula tumoral que a una célula no tumoral, y por lo tanto exhibe un aumento de localización intracelular o mayor localización intracelular en la misma. Los ensayos para evaluar el suministro intratumoral pueden incluir ensayos *in vitro* o *en vivo*, tales como ensayos de unión o ensayos de localización subcelular por medio de los cuales se compara el nivel o la cantidad unida o intracelular de un fármaco, tal como un taxano, entre células normales y células tumorales. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos, incluyendo radioinmunoensayos o ELISA (p.ej. ELISA basados en productos lisados y ELISA de infrarrojos; véase también Svojanovsky et al. (1999) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20:549-555); bioensayo basado en tubulina (véase p.ej. Suye et al. (1997) *Anal. Chem.*, 69:3633-3635); histoquímica o inmunohistoquímica (Hong et al. (2007) *Mol. Cancer. Ther.*, 6:3239); HPLC; ensayos basados en fluorescencia, que incluyen citometría de flujo y otros métodos (véase p.ej. Sheikh et al. (2001) *Biosensors & Bioelectronics*, 16:647-652), y otros ensayos similares conocidos por un experto en la técnica. Están disponibles anticuerpos contra taxano para su uso en tales métodos (véanse p.ej. Grothaus et al. (1995) *J. Nat. Prod.*, 58:1003-14; Leu et al. (1993) *Cancer Res.*, 53:1388-1391; Núm. de catálogo ab26953, Abcam). También se puede utilizar la tecnología con biosensores (véase p.ej. Braunhut et al. (2005) *Assay and Drug Dev. Tech.*, 3:77-88). Los ensayos también pueden incluir ensayos indirectos, mediante los cuales se evalúa la actividad del taxano en la maquinaria celular, incluyendo los efectos sobre la apoptosis de las células tumorales y el crecimiento tumoral, incluyendo el tamaño o volumen del tumor.

Según se utiliza en la presente memoria, un agente antihialuronano se refiere a cualquier agente que modula la síntesis o degradación de hialuronano (HA), alterando de este modo los niveles de hialuronano en un tejido o célula. Para los fines de la presente memoria, los agentes antihialuronano reducen los niveles de hialuronano en un tejido o célula en comparación con la ausencia del agente. Tales agentes incluyen compuestos que modulan la expresión

del material genético que codifica la HA sintasa (HAS) y otras enzimas o receptores implicados en el metabolismo del hialuronano, o que modulan las proteínas que sintetizan o degradan el hialuronano, incluyendo la función o actividad de HAS. Los agentes incluyen moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas u otros compuestos. Por ejemplo, los agentes anti-hialuronano incluyen, pero no se limitan a, moléculas antisentido o efectoras, anticuerpos, enzimas, inhibidores de moléculas pequeñas y análogos de sustrato de HAS.

Según se utiliza en la presente memoria, un "producto conjugado" se refiere a un polipéptido unido directa o indirectamente a uno o más polipéptidos o radicales químicos diferentes. Tales productos conjugados incluyen proteínas de fusión, los producidos por productos conjugados químicos y los producidos por cualquier otro método. Por ejemplo, un producto conjugado se refiere a una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa o polipéptido de PH20 soluble, unido directa o indirectamente a uno o más polipéptidos o radicales químicos diferentes, por lo que al menos un polipéptido de PH20 soluble está unido, directa o indirectamente a otro polipéptido o radical químico con tal que el producto conjugado conserve la actividad hialuronidasa.

Según se utiliza en la presente memoria, una "enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero" se refiere a una enzima de degradación de hialuronano que está unida directa o indirectamente a un polímero. El enlace puede ser cualquier tipo de enlace, incluyen, pero sin limitarse a, enlaces iónicos y covalentes, y cualquier otra interacción asociada suficientemente estable. La referencia a una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero significa que el producto conjugado exhibe actividad de hialuronidasa. Típicamente, el polímero conjugado exhibe al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más actividad hialuronidasa en comparación con la enzima de degradación de hialuronano que no está conjugada con un polímero.

Según se utiliza en la presente memoria, una enzima de degradación de hialuronano se refiere a una enzima que cataliza la escisión de un polímero de hialuronano (también denominado ácido hialurónico o HA) en fragmentos de menor peso molecular. Los ejemplos de enzimas de degradación de hialuronano son hialuronidasas, y condroitinasas y liasas concretas que tienen la capacidad de despolimerizar hialuronano. Las condroitinasas ilustrativas que son enzimas de degradación de hialuronano incluyen, pero no se limitan a, condroitina ABC liasa (también conocida como condroitinasa ABC), condroitina AC liasa (también conocida como condroitín sulfato liasa o condroitín sulfato eliminasa) y condroitina C liasa. La condroitina ABC liasa comprende dos enzimas, condroitín-sulfato-ABC-endoliasa (EC 4.2.2.20) y condroitín-sulfato-ABC exoliasa (EC 4.2.2.21). Las condroitín-sulfato-ABC endoliasas y condroitín-sulfato-ABC exoliasas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, las de *Proteus vulgaris* y *Flavobacterium heparinum* (la condroitín-sulfato-ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se expone en SEQ ID NO: 98; Sato et al. (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1):39-46). Las enzimas condroitinasa AC ilustrativas de las bacterias incluyen, pero no se limitan a, las de *Flavobacterium heparinum*, expuestas en SEQ ID NO: 99, *Victivallis vadensis*, expuesta en SEQ ID NO: 100, y *Arthrobacter aureus* (Tkalec et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1):29-35; Ernst et al. (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5):387-444). Las enzimas condroitinasa C ilustrativas de las bacterias incluyen, pero no se limitan a, las de *Streptococcus* y *Flavobacterium* (Hibi et al. (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48(2):121-4; Michelacci et al. (1976) J. Biol. Chem. 251:1154-8; Tsuda et al. (1999) Eur. J. Biochem. 262:127-133).

Según se utiliza en la presente memoria, hialuronidasa se refiere a una clase de enzimas de degradación de hialuronano. Las hialuronidasas incluyen hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1 o EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36), e hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas incluyen cualquiera de origen no humano que incluye, pero sin limitarse a, murino, canino, felino, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, de peces, de ranas, bacteriano y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas no humanas ilustrativas incluyen, hialuronidasas de vacas (SEQ ID NO: 10, 11, 64 y BH55 (Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.747.027 y 5.827.721)), avispa chaqueta amarilla (SEC ID NO: 12 y 13), abeja melífera (SEC ID NO: 14), avispa cara blanca (SEC ID NO: 15), avispa de papel (SEC ID NO: 16), ratón (SEQ ID NO: 17-19, 32), cerdo (SEQ ID NO: 20-21), rata (SEQ ID NO: 22-24, 31), conejo (SEQ ID NO: 25), oveja (SEQ ID NO: 26, 27, 63 y 65), chimpancé (SEQ ID NO: 101), mono Rhesus (SEQ ID NO: 102), orangután (SEQ ID NO: 28), mono cinomolgo (SEQ ID NO: 29), cobaya (SEQ ID NO: 30), *Arthrobacter* sp. (cepa FB24) (SEQ ID NO: 67), *Bdellovibrio bacteriovorus* (SEQ ID NO: 68), *Propionibacterium acnes* (SEQ ID NO: 69), *Streptococcus agalactiae* ((SEQ ID NO: 70); 18RS21 (SEQ ID NO: 71); serotipo Ia (SEQ ID NO: 72); y serotipo III (SEQ ID NO: 73)), *Staphylococcus aureus* (cepa COL (SEQ ID NO: 74); cepa MRSA252 (SEQ ID NO: 75 y 76); cepa MSSA476 (SEQ ID NO: 77); cepa NCTC 8325 (SEQ ID NO: 78); cepa bovina RF122 (SEQ ID NO: 79 y 80) y cepa USA300 (SEQ ID NO: 81)), *Streptococcus pneumoniae* ((SEQ ID NO: 82); cepa ATCC BAA-255/R6 (SEQ ID NO: 83); y serotipo 2, cepa D39/NCTC 7466 (SEQ ID NO: 84)), *Streptococcus pyogenes* (serotipo M1 (SEQ ID NO: 85); serotipo M2, cepa MGAS10270 (SEQ ID NO: 86); serotipo M4, cepa MGAS10750 (SEQ ID NO: 87); serotipo M6 (SEQ ID NO: 88); serotipo M12, cepa MGAS2096 (SEC ID NO: 89 y 90); serotipo M12, cepa MGAS9429 (SEC ID NO: 91) y serotipo M28 (SEC ID NO: 92)); *Streptococcus suis* (SEQ ID NO: 93-95); *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601/ES114 (SEQ ID NO: 96)), y la enzima hialuronidasa de *Streptomyces hyaluronolyticus*, que es específica para el ácido hialurónico y no escinde la condroitina o el condroitín sulfato (Ohya, T. y Kaneko, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198:607). Las hialuronidasas también incluyen las de origen humano. Las hialuronidasas humanas ilustrativas incluyen HYAL1 (SEQ ID NO: 36), HYAL2 (SEQ ID NO: 37), HYAL3 (SEQ ID NO: 38), HYAL4 (SEQ ID

NO: 39) y PH20 (SEQ ID NO: 1). También se incluyen entre las hialuronidasas hialuronidasas solubles, incluyendo PH20 ovina y bovina, PH20 humana soluble y rHuPH20 soluble. Los ejemplos de hialuronidasas solubles bovinas u ovinas comercialmente disponibles incluyen Vitrase® (hialuronidasa ovina), Amphadase® (hialuronidasa bovina) e Hydase™ (hialuronidasa bovina).

Según se utiliza en la presente memoria, "hialuronidasa testicular bovina purificada" se refiere a una hialuronidasa bovina purificada a partir de extractos testiculares bovinos (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núm. 2.488.564, 2.488.565, 2.806.815, 2.808.362, 2.676.139, 2.795.529, 5.747.027 y 5.827.721). Los ejemplos de hialuronidasas testiculares bovinas purificadas disponibles comercialmente incluyen Amphadase® e Hydase™, e hialuronidasas bovinas, que incluyen, pero no se limitan a, las disponibles de Sigma Aldrich, Abnova, EMD Chemicals, GenWay Biotech, Inc., Raybiotech, Inc. y Calzyme. También se incluyen hialuronidasas bovinas producidas recombinantemente, tales como, pero sin limitación, aquellas generadas por la expresión de una molécula de ácido nucleico expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 190-192.

Según se utiliza en la presente memoria, "hialuronidasa testicular ovina purificada" se refiere a una hialuronidasa ovina purificada a partir de extractos testiculares ovinos (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núm. 2.488.564, 2.488.565 y 2.806.815 y la Publicación PCT internacional Núm. WO1005/118799). Los ejemplos de extracto testicular ovino purificado disponible comercialmente incluyen Vitrase® e hialuronidasas ovinas, incluyendo, pero limitadas a, las disponibles de Sigma Aldrich, Cell Sciences, EMD Chemicals, GenWay Biotech, Inc., Mybiosource.com y Raybiotech, Inc. También se incluyen hialuronidasas ovinas producidas recombinantemente, tales como, pero sin limitación, las generadas por la expresión de una molécula de ácido nucleico expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 66 y 193-194.

Según se utiliza en la presente memoria, "PH20" se refiere a un tipo de hialuronidasa que se produce en los espermatozoides y es activa en condiciones neutras. La PH-20 aparece en la superficie de los espermatozoides y en el acrosoma derivado de los lisosomas, donde está unida a la membrana acrosómica interna. La PH20 incluye las de cualquier origen incluyendo, pero sin limitarse a, las de origen humano, de chimpancé, mono Cynomolgus, mono Rhesus, murino, bovino, ovino, de cobaya, de conejo y de rata. Los polipéptidos de PH20 ilustrativos los de ser humano (SEQ ID NO: 1), chimpancé (SEQ ID NO: 101), mono Rhesus (SEQ ID NO: 102), mono Cynomolgus (SEQ ID NO: 29), vaca (p.ej., SEQ ID NO: 11 y 64), ratón (SEQ ID NO: 32), rata (SEQ ID NO: 31), conejo (SEQ ID NO: 25), oveja (SEQ ID NO: 27, 63 y 65) y cobaya (SEQ ID NO: 30).

La referencia a enzimas de degradación de hialuronano incluye polipéptidos enzimáticos de degradación de hialuronano precursores y polipéptidos enzimáticos de degradación de hialuronano maduros (tales como aquellos en los que se ha eliminado una secuencia señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad e incluyen variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de empalme y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con los polipéptidos precursores expuestos en SEC ID NO: 1 y 10-48, 63-65, 67-102, o las formas maduras de los mismos. Por ejemplo, la referencia a la enzima de degradación de hialuronano también incluye las variantes del polipéptido precursor de PH20 humana expuestas en SEC ID NO: 50-51. Las enzimas de degradación de hialuronano también incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, PEGilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones polipeptídicas conocidas en la técnica. Una hialuronidasa PH20 truncada es cualquier forma abreviada C-terminal de la misma, particularmente formas que están truncadas y activas en condiciones neutras cuando se N-glicosilan.

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

Según se utiliza en la presente memoria, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluye polipéptidos de PH20 que carecen de la totalidad o de una porción de la secuencia de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C de manera que tras la expresión, los polipéptidos son solubles bajo condiciones fisiológicas. La solubilidad puede evaluarse mediante cualquier método adecuado que demuestre solubilidad bajo condiciones fisiológicas. Un ejemplo de tales métodos es el ensayo Triton® X-114, que evalúa el reparto en la fase acuosa y que se describe anteriormente y en los ejemplos. Además, un polipéptido de PH20 humana soluble, si se produce en células CHO,

tales como células CHO-S, es un polipéptido que se expresa y se secreta al medio de cultivo celular. Los polipéptidos de PH20 humana soluble, sin embargo, no se limitan a los producidos en células CHO, sino que se pueden producir en cualquier célula o mediante cualquier método, incluyendo la expresión recombinante y la síntesis de polipéptidos. La referencia a la secreción por células CHO es definitiva. Por lo tanto, si un polipéptido puede ser expresado y secretado por células CHO y es soluble, es decir se reparte en la fase acuosa cuando se extrae con Triton® X-114, es un polipéptido de PH20 soluble, se produzca o no de esa manera. Los polipéptidos precursores para los polipéptidos de sHuPH20 pueden incluir una secuencia señal, tal como una secuencia señal heteróloga o no heteróloga (es decir nativa). Los ejemplos de los precursores son aquellos que incluyen una secuencia señal, tal como la secuencia señal de 35 aminoácidos nativa en las posiciones de aminoácidos 1-35 (véase, p.ej., aminoácidos 1-35 de SEQ ID NO: 1).

Según se utiliza en la presente memoria, una "PH20 soluble extendida" o "esPH20" incluye polipéptidos de PH20 solubles que contienen residuos hasta la secuencia de señal de unión al ancla de GPI y uno o más residuos contiguos de la secuencia señal de unión al ancla de GPI de manera que la esPH20 sea soluble bajo condiciones fisiológicas. La solubilidad en condiciones fisiológicas se puede determinar mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede evaluarse mediante el ensayo Triton® X-114 descrito anteriormente y en los ejemplos. Además, como se comentó anteriormente, una PH20 soluble es, si se produce en células CHO, tales como células CHO-S, un polipéptido que se expresa y se secreta al medio de cultivo celular. Los polipéptidos de PH20 humana soluble, sin embargo, no se limitan a los producidos en células CHO, sino que se pueden producir en cualquier célula o mediante cualquier método, incluyendo la expresión recombinante y la síntesis de polipéptidos. La referencia a la secreción por células CHO es definitiva. Por lo tanto, si un polipéptido puede ser expresado y secretado por células CHO y es soluble, es decir se reparte en la fase acuosa cuando se extrae con Triton® X-114, es un polipéptido de PH20 soluble, se produzca o no de esa manera. Los polipéptidos de esPH20 soluble de seres humanos incluyen, además de los residuos 36-490, uno o más aminoácidos contiguos desde la posición de residuo de aminoácido 491 de SEC ID NO: 1, inclusive, de manera que el polipéptido resultante es soluble. Los polipéptidos solubles de esPH20 humana ilustrativos son aquellos que tienen residuos de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 y 36-497 de SEQ ID NO: 1. Son ejemplos de estos aquellos con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 151-154 y 185-187. También se incluyen variantes alélicas y otras variantes, tal como cualquiera con 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con los correspondientes polipéptidos de SEC ID NO: 151-154 y 185-187 que conservan actividad en condiciones neutras y son solubles. La referencia a la identidad de secuencia se refiere a variantes con sustituciones de aminoácidos.

Según se utiliza en la presente memoria, la referencia a las "esPH20" incluye polipéptidos de esPH20 precursores y polipéptidos de esPH20 maduros (tales como aquellos en los que se ha eliminado una secuencia señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad enzimática (conservación de al menos 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más de la forma completa) y son solubles, e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de empalme y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40%, 45 %, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con los polipéptidos precursores expuestos en SEC ID NO: 1 y 3, o las formas maduras de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, la referencia a las "esPH20" también incluye aquellas que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellos que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitación, PEGilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones polipeptídicas conocidas en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, "PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20)" se refiere a una composición que contiene una forma soluble de PH20 humana expresada de forma recombinante y secretada en células de ovario de hámster chino (CHO). La rHuPH20 soluble está codificada por una molécula de ácido nucleico que incluye la secuencia señal y se expone en SEC ID NO: 49. El ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. Puesto que se produce en el medio de cultivo, existe heterogeneidad en el extremo C de manera que el producto incluye una mezcla de especies que puede incluir una o más de SEC ID NO: 4 a SEQ ID NO: 9 en diversa abundancia.

De forma similar, para otras formas de PH20, tales como las esPH20, los polipéptidos expresados recombinantemente y las composiciones de los mismos pueden incluir una pluralidad de especies cuyo extremo C exhibe heterogeneidad. Por ejemplo, las composiciones de esPH20 expresadas de forma recombinante producidas por la expresión del polipéptido de SEC ID NO: 151, que codifica una esPH20 que tiene los aminoácidos 36-497, pueden incluir formas con menos aminoácidos, tales como 36-496 o 36-495.

Según se utiliza en la presente memoria, un "radical unido a N" se refiere a un residuo de aminoácido de asparragina (N) de un polipéptido que es capaz de glicosilarse por modificación postraducciona de un polipéptido. Los radicales unidos a N ilustrativos de PH20 humana incluyen los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humana expuestos en SEC ID NO: 1.

Según se utiliza en la presente memoria, un "polipéptido N-glicosilado" se refiere a un polipéptido de PH20 o forma truncada que contiene un enlace oligosacárido de al menos tres residuos de aminoácidos unidos a N, por ejemplo, radicales unidos a N correspondientes a los residuos de aminoácidos N235, N368 y N393 de SEQ ID NO: 1. Un polipéptido N-glicosilado puede incluir un polipéptido en el que tres, cuatro, cinco y hasta todos los restos unidos a N están unidos a un oligosacárido. Los oligosacáridos unidos a N pueden incluir oligomanosa, oligosacáridos complejos, híbridos o sulfatados u otros oligosacáridos y monosacáridos.

Según se utiliza en la presente memoria, un "polipéptido parcialmente N-glicosilado" se refiere a un polipéptido que contiene mínimamente un N-acetilglucosaminoglucano unido a al menos tres radicales unidos a N. Un polipéptido parcialmente glicosilado puede incluir diversas formas de glicano, incluyendo monosacáridos, oligosacáridos y formas de azúcar ramificadas, que incluyen las formadas por el tratamiento de un polipéptido con EndoH, EndoF1, EndoF2 y/o EndoF3.

Según se utiliza en la presente memoria, un "polipéptido de PH20 desglicosilado" se refiere a un polipéptido de PH20 en el que menos de todos los sitios de glicosilación posibles están glicosilados. La desglicosilación se puede efectuar, por ejemplo, eliminando la glicosilación, previniéndola o modificando el polipéptido para eliminar un sitio de glicosilación. Los sitios concretos de N-glicosilación no son necesarios para la actividad, mientras que otros sí lo son.

Según se utiliza en la presente memoria, un "polímero" se refiere a cualquier radical natural o sintético de alto peso molecular que se compone de unidades repetitivas. Los polímeros incluyen, pero sin limitación, radicales de polietilenglicol, dextrano, celulosa y ácido siálico. Estos y otros polímeros ilustrativos se describen en la presente memoria, y muchos son conocidos en la técnica. Para los fines de la presente memoria, el polímero se puede conjugar con, es decir unir de manera estable directa o indirectamente a través de un conector, a un polipéptido. Tales productos conjugados poliméricos, típicamente aumentan la semivida en suero, e incluyen, pero sin limitación, radicales siálicos, radicales de PEGilación, dextrano y azúcares y otros radicales, por ejemplo de glicosilación. Por ejemplo, las hialuronidasas, tales como una PH20 soluble o rHuPH20, pueden conjugarse con un polímero.

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

Según se utiliza en la presente memoria, un agente anticanceroso o agente quimioterapéutico se refiere a un agente que es capaz de destruir células que se dividen rápidamente, tales como células cancerosas. Un experto en la técnica está familiarizado con agentes anticancerosos, incluyen agentes quimioterapéuticos. Los agentes ilustrativos se describen en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, un análogo de nucleósido (o análogo) se refiere a un agente que reemplaza o imita uno de las unidades estructurales de los ácidos nucleicos, tal como un nucleósido de purina o pirimidina, durante la replicación del ADN. El proceso puede detener el crecimiento del tumor, ya que no se pueden anclar nucleósidos adicionales. Un ejemplo de un análogo de nucleósido es gemcitabina, que, es un análogo de desoxicitidina y, tras la activación metabólica, forma un trifosfato que imita o reemplaza al nucleósido de citidina para incorporarlo al ADN e inhibir competitivamente la síntesis de ADN.

Según se utiliza en la presente memoria, una nucleósido desaminasa se refiere a una enzima que efectúa la desaminación de un nucleósido. Por ejemplo, la citidina desaminasa (CDA) desamina citidina y desoxicitidina a uridina y desoxiuridina, respectivamente. La adenosina desaminasa (ADA) desamina la adenosina, convirtiéndola en el nucleósido relacionado inosina mediante la sustitución del grupo amino por un grupo hidroxilo.

Según se utiliza en la presente memoria, un sustrato de una nucleósido desaminasa es una molécula que puede desaminarse a un metabolito inactivo y, por lo tanto, inactivarse, en presencia de una nucleósido desaminasa. Los ensayos para evaluar la desaminación son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o espectrometría de masas para metabolitos y metabolitos desaminados, ensayos de desaminación tales como un ensayo de desaminasa basado en UDG utilizando exceso de uracilo-ADN glicosilasa (véase p.ej. Morgan et al. (2004) J. Biol. Chem., 279:52353-52360) o evaluando la citotoxicidad en células conocidas por expresar una nucleósido desaminasa.

Según se utiliza en la presente memoria, la frase "suficiente para reducir los niveles de proteína o la actividad de proteína nucleósido desaminasa" se refiere a la cantidad de taxano que se requiere para inhibir la actividad de una nucleósido desaminasa. Por ejemplo, la inhibición puede evaluarse analizando la actividad de desaminación de una desaminasa (p.ej. citidina desaminasa) utilizando ensayos para la desaminación como se describió anteriormente. La inhibición también puede evaluarse analizando los niveles de proteína desaminasa intracelular. Los ensayos para evaluar proteínas subcelulares son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA basado en células, citometría de flujo o métodos de detección de proteínas tales como transferencia Western.

Generalmente, tales ensayos se pueden realizar en productos lisados celulares o células permeabilizadas. Por ejemplo, la transferencia Western para la citidina desaminasa se puede realizar solubilizando productos lisados celulares totales, separando proteínas, e inmunotransferencia para desaminasa utilizando un anticuerpo contra CDA (p.ej. Núm. de Cat. ab82346, Abcam) seguido de incubación con un anticuerpo secundario de peroxidasa de rábano picante y detección. Generalmente, una cantidad es suficiente para reducir los niveles de proteína o la actividad de proteína nucleósido desaminasa si el nivel o actividad de proteína se reduce al menos o al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más.

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

Según se utiliza en la presente memoria, un derivado se refiere a una forma de un fármaco que ha sufrido un cambio o modificación a partir de un fármaco o agente de referencia, pero que aún conserva la actividad (p.ej. exhibe aumento o disminución de actividad) en comparación con el fármaco o agente de referencia. Típicamente, una forma derivada de un compuesto significa que una cadena lateral del compuesto se ha modificado o cambiado.

Según se utiliza en la presente memoria, un análogo o análogo de un fármaco o agente es un fármaco o agente que están relacionados con un fármaco de referencia, pero cuyas actividades químicas y biológicas pueden ser diferentes. Típicamente, los análogos exhiben actividades similares a un fármaco o agente de referencia, pero la actividad puede aumentarse o reducirse o mejorarse de otro modo. Típicamente, una forma análoga de un compuesto o fármaco significa que el núcleo de la estructura se modifica o cambia en comparación con un fármaco de referencia.

Según se utiliza en la presente memoria, "actividad" se refiere a una actividad o actividades funcionales de un polipéptido o parte del mismo asociadas con una proteína íntegra (completa). Por ejemplo, los fragmentos activos de un polipéptido pueden exhibir una actividad de una proteína completa. Las actividades funcionales incluyen, pero no se limitan a, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (capacidad de unirse o competir con un polipéptido por la unión a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, capacidad de formar multímeros y capacidad de unirse específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

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

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, una secuencia señal de unión al ancla de GPI es una secuencia de aminoácidos C-terminal que dirige la adición de un ancla de GPI preformada al polipéptido dentro del lumen del RE. Las secuencias señal de unión al ancla de GPI están presentes en los polipéptidos precursores de los polipéptidos anclados a GPI, tales como los polipéptidos de PH20 anclados a GPI. La secuencia señal de unión al ancla de GPI C-terminal contiene típicamente una región predominantemente hidrófoba de 8-20 aminoácidos, precedida por una región espaciadora hidrófila de 8-12 aminoácidos, inmediatamente aguas abajo del sitio ω , o sitio de unión al ancla de GPI. Las secuencias señal de unión al ancla de GPI se pueden identificar utilizando métodos bien conocidos en

la técnica. Estos incluyen, pero no están limitados a, métodos *in silico* y algoritmos (véase, p.ej. Udenfriend et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582, Eisenhaber et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 292:741-758, Fankhauser et al., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852, Omaetxebarria et al., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960, Pierleoni et al., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392), incluyendo los que están disponibles en sitios web bioinformáticos, tales como el sitio de herramientas ExpASY Proteomics (p.ej., el sitio de la red en el ámbito mundial expasy.ch/tools/).

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

Según se utiliza en la presente memoria, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene una longitud mayor que o igual a 2 aminoácidos, y una longitud inferior o igual a 40 aminoácidos.

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

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

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

Tabla 1 - Tabla de correspondencia

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

SÍMBOLO		
1 Letra	3 Letras	AMINOÁCIDOS
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Áspid	Ácido aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

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

Según se utiliza en la presente memoria, los "α-aminoácidos naturales" son los residuos de aquellos 20 α-aminoácidos encontrados en la naturaleza que se incorporan a la proteína mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm cognado en seres humanos. Los aminoácidos no naturales incluyen así, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos naturales e incluyen, pero no se limitan a, los estereoisómeros D de los aminoácidos. Los ejemplos de aminoácidos no naturales se describen en la presente memoria y son conocidos por los expertos en la técnica.

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, el término polinucleótido significa un polímero de hebra sencilla o doble hebra de desoxirribonucleótidos o bases ribonucleotídicas leídas del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar a partir de fuentes naturales, sintetizar *in vitro*, o preparar a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se proporciona en la presente memoria en términos de nucleótidos (abreviado "nt") o pares de bases (abreviado "pb"). El término nucleótidos se utiliza para moléculas de hebra sencilla y de doble hebra cuando el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas de doble hebra, se utiliza para denotar la longitud total y se entenderá que es equivalente al término pares de bases. Los expertos en la técnica reconocerán que la longitud de las dos cadenas de un polinucleótido de doble hebra puede diferir ligeramente y que sus extremos pueden escalonarse; por lo tanto, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido de doble hebra pueden no estar emparejados. Tales extremos no emparejados, en general, no superarán los 20 nucleótidos de longitud.

Según se utiliza en la presente memoria, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede basarse en el grado de identidad y/u homología de las secuencias de residuos y los residuos contenidos en ellas. Los expertos en la técnica conocen métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se alinean de una manera que produce un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere al grado en que las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariables. El alineamiento de las

secuencias de aminoácidos, y en cierta medida de las secuencias de nucleótidos, también puede tener en cuenta las diferencias conservativas y/o las sustituciones frecuentes de aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son aquellas que conservan las propiedades fisicoquímicas de los residuos involucrados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas a lo largo de toda la longitud de las secuencias e incluir todos los residuos) o locales (alineamiento de una parte de las secuencias que incluye solo la región o regiones más similares).

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

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

Si dos moléculas cualesquiera tienen secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que son al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas" u "homólogas" se puede determinar utilizando algoritmos informáticos conocidos como el programa "FASTA", utilizando, por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 85:2444 (otros programas incluyen el paquete del programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul, S.F., et al., *J Mol Biol* 215:403 (1990)); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994 y Carrillo et al. (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Por ejemplo, la función BLAST de la base de datos de información del Centro Nacional de Biotecnología se puede utilizar para determinar la identidad. Otros programas comercial o públicamente disponibles incluyen el programa "MegAlign" de DNASTar (Madison, WI) y el programa "Gap" del Genetics Computer Group (UWG) de la Universidad de Wisconsin (Madison WI). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico se puede determinar, por ejemplo, comparando información de secuencia utilizando un programa informático GAP (p.ej., Needleman et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, revisado por Smith y Waterman ((1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482). En resumen, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación única (que contiene un valor de 1 para las identidades y 0 para las no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745, como describen Schwartz y Dayhoff, eds., en *ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE*, Fundación Nacional de Investigación Biomédica, pág. 353-358 (1979)); (2) una penalización de 3.0 por cada espacio y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada espacio; y (3) no hay penalización por los espacios finales.

Por lo tanto, según se utiliza en la presente memoria, el término "identidad" u "homología" representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y uno de referencia. Según se utiliza en la presente memoria, el término al menos "idéntico en 90% a" se refiere a porcentajes de identidades de 90 a 99,99 con respecto a la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de referencia del polipéptido. La identidad a un nivel de 90% o más es indicativa del hecho de que, suponiendo fines ilustrativos, se compara una longitud de polipéptido de ensayo y de referencia de 100 aminoácidos. No más de 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de ensayo difiere del polipéptido de referencia. Comparaciones similares se pueden realizar entre polinucleótidos de ensayo y de referencia. Tales diferencias se pueden representar como mutaciones puntuales

distribuidas aleatoriamente en toda la longitud de un polipéptido o pueden agruparse en una o más ubicaciones de longitud variable hasta el máximo permisible, p.ej. una diferencia de 10/100 aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos. En el nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente 85-90%, el resultado debe ser independiente del programa y del ajuste de los parámetros de espacio; tales altos niveles de identidad se pueden evaluar fácilmente, a menudo mediante alineamiento manual sin depender de soporte lógico.

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

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, "hibrida específicamente" se refiere a reasociación, mediante emparejamiento de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (p.ej. un oligonucleótido) a una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la técnica están familiarizados con parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan a la hibridación específica, tales como la longitud y la composición de la molécula concreta. Los parámetros particularmente relevantes para la hibridación *in vitro* incluyen adicionalmente la temperatura de reasociación y lavado, la composición del tampón y la concentración de sal. Las condiciones de lavado ilustrativas para eliminar moléculas de ácido nucleico no específicamente unidas con alta rigurosidad son 0,1 x SSPE, SDS al 0,1%, 65°C, y a rigurosidad media son 0,2 x SSPE, SDS al 0,1%, 50°C. Se conocen condiciones de rigurosidad equivalentes en la técnica. El experto en la técnica puede ajustar fácilmente estos parámetros para lograr la hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico diana apropiada para una aplicación concreta. Complementarias, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridarse, típicamente con menos de 25%, 15% o 5% de emparejamientos erróneos entre nucleótidos opuestos. Si es necesario, se especificará el porcentaje de complementariedad. Típicamente, las dos moléculas se seleccionan de manera que se hibriden en condiciones de alta rigurosidad.

Según se utiliza en la presente memoria, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar para que la propiedad de interés no se modifique lo suficiente, de forma que el producto sustancialmente idéntico se puede utilizar en lugar del producto.

Según se utiliza en la presente memoria, también se entiende que los términos "sustancialmente idéntico" o "similar" varían con el contexto tal como lo entienden los expertos en la técnica relevante.

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

con un tipo salvaje y/o forma predominante de un polipéptido. La referencia a una variante alélica en la presente memoria generalmente se refiere a variaciones en las proteínas entre miembros de la misma especie.

Según se utiliza en la presente memoria, "alelo", que se utiliza indistintamente en la presente memoria con "variante alélica" se refiere a formas alternativas de un gen o porciones del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o posición en los cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigótico para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigoto para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un solo nucleótido o en varios nucleótidos, y pueden incluir modificaciones tales como sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

Según se utiliza en la presente memoria, las variantes de especie se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, tales como ratón y ser humano. Por ejemplo, para PH20, los ejemplos de variantes de especies proporcionadas en la presente memoria son PH20 de primate, tales como, pero sin limitarse a, ser humano, chimpancé, macaco y mono cinomolgo. Generalmente, las variantes de especie tienen una identidad de secuencia de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o más. Los residuos correspondientes entre las variantes de especie pueden determinarse comparando y alineando secuencias para maximizar el número de nucleótidos o residuos coincidentes, por ejemplo, de modo que la identidad entre las secuencias sea igual o mayor que 95%, igual o mayor que 96%, igual o mayor que 97%, igual o mayor que 98%, o igual o mayor que 99%. A la posición de interés se le asigna a continuación el número asignado en la molécula de ácido nucleico de referencia. El alineamiento se puede efectuar manualmente o visualmente, en particular, cuando la identidad de secuencia es superior a 80%.

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, la modificación se refiere a la modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye deleciones, inserciones y reemplazos (p.ej. sustituciones) de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Los ejemplos de modificaciones son sustituciones de aminoácidos. Un polipéptido sustituido con un aminoácido puede exhibir una identidad de secuencia de 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o más con un polipéptido que no contiene las sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas o no conservativas. Generalmente, cualquier modificación de un polipéptido conserva una actividad del polipéptido. Los métodos para modificar un polipéptido son rutinarios para los expertos en la técnica, por ejemplo mediante el uso de metodologías de ADN recombinante.

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

Tabla 2

Residuo original	Sustitución conservativa ilustrativa
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

Residuo original	Sustitución conservativa ilustrativa
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

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

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

- 10 Según se utiliza en la presente memoria, el polipéptido o proteína aislados o purificados o porción biológicamente activa de los mismos están sustancialmente libres de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido del que deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Se puede determinar que las preparaciones están sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables según se determina mediante métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC),
15 utilizados por los expertos en la técnica para evaluar tal pureza, o suficientemente puros como para que una purificación adicional no altere de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la técnica conocen métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos químicamente puros sustancialmente. Sin embargo, un compuesto químicamente puro sustancialmente puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, la purificación
20 adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

- Por lo tanto, la referencia a un polipéptido sustancialmente purificado, tal como una PH20 soluble sustancialmente purificada, se refiere a preparaciones de proteínas que están sustancialmente libres de material celular incluyendo preparaciones de proteínas en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce recombinantemente. En una realización, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de proteínas no enzimáticas (también referidas en la presente memoria como proteínas contaminantes), generalmente menos de aproximadamente 20% de proteínas no enzimáticas o 10% de proteínas no enzimáticas o menos de aproximadamente 5% de proteínas no enzimáticas. Cuando la proteína enzimática se produce de forma recombinante, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína enzimática.
25

- Según se utiliza en la presente memoria, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas enzimáticas en las que la proteína se separa de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco), 20%, 10%, 5% o menos de precursores químicos o productos químicos o componentes no enzimáticos.
35

- Según se utiliza en la presente memoria, sintético, con referencia a, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico sintética o un gen sintético o un péptido sintético se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula de polipéptido que se produce mediante métodos recombinantes y/o mediante métodos de síntesis química.
40

- Según se utiliza en la presente memoria, la producción por medios recombinantes o el uso de métodos de ADN recombinante significa el uso de los métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.
45

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, el vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales". Los vectores virales son virus modificados genéticamente que están conectados operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos a las células.

Según se utiliza en la presente memoria, "operablemente" o "conectado operativamente" cuando se hace referencia a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de modo que funcionen en concierto para los fines previstos, p.ej., la transcripción se inicia aguas abajo del promotor y aguas arriba de cualquier secuencia transcrita. El promotor es usualmente el dominio al que se une la maquinaria transcripcional para iniciar la transcripción y avanza a través del segmento codificante hacia el terminador.

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "evaluar" incluya una determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteína, tal como una enzima, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también para obtener un índice, proporción, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, no es necesario en absoluto que la especie química realmente detectada sea el propio producto escindido enzimáticamente, sino que puede ser, por ejemplo, un derivado del mismo o alguna otra sustancia adicional. Por ejemplo, la detección de un producto de escisión puede ser un radical detectable tal como un radical fluorescente.

Según se utiliza en la presente memoria, la actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o a las respuestas fisiológicas que se producen después de la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Se pueden observar actividades biológicas en sistemas *in vitro* diseñados para someter a ensayo o utilizar tales actividades. Por lo tanto, para los fines de la presente memoria, una actividad biológica de una enzima hialuronidasa es su degradación de ácido hialurónico.

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, la administración directa se refiere a una composición que se administra sin dilución.

Según se utiliza en la presente memoria, una formulación de dosificación única se refiere a una formulación para uso una sola vez. Típicamente, una formulación de dosificación única es para administración directa.

5 Según se utiliza en la presente memoria, una formulación de dosificación múltiple se refiere a una formulación para su uso en administraciones repetidas.

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

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

15 Según se utiliza en la presente memoria, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo que resulta de una causa o afección incluyendo, pero sin limitarse a, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas y que se caracteriza por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en la presente memoria son enfermedades y trastornos asociados con hialuronano.

20 Según se utiliza en la presente memoria, "administración intravenosa" se refiere a la administración de un agente terapéutico directamente en una vena.

25 Según se utiliza en la presente memoria, un "cáncer asociado a hialuronano" o "cánceres ricos en hialuronano" incluyen cánceres en los que los niveles de hialuronano se elevan como causa, consecuencia o como se observa de otro modo en la enfermedad o afección. Los cánceres o tumores asociados a hialuronano se asocian a niveles elevados de hialuronano en un tejido o célula, aumento de la presión del líquido intersticial, disminución del volumen vascular y/o aumento del contenido de agua en un tejido. Tales cánceres incluyen, por ejemplo, tumores, incluyendo tumores sólidos tales como cánceres en fase tardía, cánceres metastásicos, cánceres indiferenciados, cáncer de ovario, carcinoma in situ (ISC), carcinoma de células escamosas (CCE), cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de colon y otros cánceres.

35 Según se utiliza en la presente memoria, los niveles elevados de hialuronano se refieren a las cantidades de hialuronano en un tejido, fluido corporal o célula en particular, dependiendo de la enfermedad o condición, consecuencia u observada de otro modo en la enfermedad. Por ejemplo, como consecuencia de la presencia de un tumor rico en hialuronano, los niveles de hialuronano (HA) pueden elevarse en fluidos corporales, tales como sangre, orina, saliva y suero, y/o en el tejido o célula tumoral. El nivel se puede comparar con un patrón u otro control adecuado, como una muestra comparable de un sujeto que no tiene la enfermedad asociada a HA.

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

45 Según se utiliza en la presente memoria, un agente farmacéuticamente eficaz incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, anestésicos, vasoconstrictores, dispersantes, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo fármacos de molécula pequeña y proteínas terapéuticas.

50 Según se utiliza en la presente memoria, tratamiento significa cualquier manera en la que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, mejoran o se alteran beneficiosamente de otro modo.

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

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, aproximadamente lo mismo significa dentro de una cantidad que un experto en la técnica consideraría como lo mismo o dentro de un intervalo aceptable de error. Por ejemplo, típicamente, para composiciones farmacéuticas, dentro de al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5% o 10% se considera aproximadamente lo mismo. Tal cantidad puede variar dependiendo de la tolerancia a la variación en la composición concreta por parte de los sujetos.

Según se utiliza en la presente memoria, el régimen de dosificación se refiere a la cantidad de agente, por ejemplo, la composición que contiene un agente antihialuronano, por ejemplo una hialuronidasa soluble u otro agente, administrada, y la frecuencia de administración. El régimen de dosificación es una función de la enfermedad o afección que se vaya a tratar, y por lo tanto puede variar.

Según se utiliza en la presente memoria, la frecuencia de administración se refiere al tiempo entre las administraciones de tratamiento sucesivas. Por ejemplo, la frecuencia puede ser de días, semanas o meses. Por ejemplo, la frecuencia puede ser más de una vez por semana, por ejemplo, dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces por semana o diariamente. La frecuencia también puede ser de una, dos, tres o cuatro semanas. La frecuencia concreta está en función de la enfermedad o afección concretas tratadas. Generalmente, la frecuencia es más de una vez por semana, y generalmente es dos veces por semana.

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

Según se utiliza en la presente memoria, cuando se hace referencia a la dosificación basada en mg/kg del sujeto, se considera que un sujeto humano medio tiene una masa de aproximadamente 70 kg-75 kg, tal como 70 kg y un área de superficie corporal (ASC) de 1,73.

Según se utiliza en la presente memoria, el alivio de los síntomas de una enfermedad o trastorno concretos mediante un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otro agente terapéutico, se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas o, efectos adversos de una afección, tal como, por ejemplo, la reducción de los efectos adversos asociados con o que se producen tras la administración de un agente antihialuronano, tal como una hialuronidasa PEGilada.

Según se utiliza en la presente memoria, la prevención o profilaxis se refiere a la reducción del riesgo de desarrollar una enfermedad o afección.

Según se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosis terapéuticamente eficaz" se refieren a la cantidad de un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Por lo tanto, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

Según se utiliza en la presente memoria, la forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, una formulación de dosificación única se refiere a una formulación en forma de una dosis única.

Según se utiliza en la presente memoria, la formulación para administración directa significa que la composición no requiere una dilución adicional para su administración.

Según se utiliza en la presente memoria, un "artículo de fabricación" es un producto que se fabrica y se comercializa. Según se utiliza en esta solicitud, se pretende que el término abarque agentes antihialuronano, por ejemplo enzima de degradación de hialuronano, tal como hialuronidasa, y composiciones de segundo agente contenidas en artículos de envasado. Por ejemplo, un segundo agente es un corticosteroide, un taxano dirigido a un tumor o un agente quimioterapéutico.

Según se utiliza en la presente memoria, fluido se refiere a cualquier composición que pueda fluir. Por lo tanto, los fluidos abarcan de ese modo composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones similares.

Según se utiliza en la presente memoria, una combinación, tal como una combinación de composiciones proporcionadas en la presente memoria, se refiere a una asociación de elementos de la combinación.

Según se utiliza en la presente memoria, un kit se refiere a una combinación de componentes, tal como una combinación de las composiciones de la presente memoria y otro elemento para un fin que incluye, pero no se limita a, reconstitución, activación e instrumentos/dispositivos para suministro, diagnóstico y evaluación de una actividad o propiedad biológicas. Los kits incluyen opcionalmente instrucciones de uso.

5 Según se utiliza en la presente memoria, un extracto o producto lisado celular se refiere a una preparación o fracción que se prepara a partir de una célula lisada o rota.

10 Según se utiliza en la presente memoria, el animal incluye cualquier animal, tal como, pero no limitado a primates incluyendo seres humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves de corral, tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen a los seres humanos como animal contemplado. Las hialuronidasas proporcionadas en la presente memoria son de cualquier fuente, animal, vegetal, procariota y fúngica. La mayoría de las hialuronidasas son de origen animal, incluyendo de origen mamífero. Generalmente las hialuronidasas son de origen humano.

15 Según se utiliza en la presente memoria, los tratamientos anticancerosos incluyen la administración de fármacos y otros agentes para tratar el cáncer, y también protocolos de tratamiento, tales como cirugía y radiación. Los tratamientos contra el cáncer incluyen la administración de agentes contra el cáncer.

20 Según se utiliza en la presente memoria, un agente anticanceroso se refiere a cualquier agente o compuesto utilizado en el tratamiento contra el cáncer. Estos incluyen cualquier agente, cuando se utiliza solo o combinado con otros compuestos, que puede aliviar, reducir, mejorar, prevenir o colocar o mantener en un estado de remisión de síntomas clínicos o marcadores de diagnóstico asociados con tumores y cáncer, y se puede utilizar en combinaciones y composiciones proporcionadas en la presente memoria. Los agentes anticancerosos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, enzimas de degradación de hialuronano, tales como las enzimas de degradación de hialuronano PEGilado proporcionadas en la presente memoria utilizadas individualmente o combinadas con otros agentes anticancerosos, tales como agentes quimioterapéuticos, polipéptidos, anticuerpos, péptidos, moléculas pequeñas o vectores de terapia génica, virus o ADN.

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

35 Según se utiliza en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "uno" y "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a un compuesto que comprende o contiene "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

40 Según se utiliza en la presente memoria, los intervalos y las cantidades se pueden expresar como "aproximadamente" un valor o intervalo concretos. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, "aproximadamente de 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

45 Según se utiliza en la presente memoria, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descritas posteriormente tiene lugar o no, y que la descripción incluye casos en los que se produce dicho evento o circunstancia y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

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

B. Terapia combinada con el agente antihialuronano

55 Se proporcionan en la presente memoria terapias combinadas de un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano, y un taxano dirigido a un tumor, tal como paclitaxel unido a albúmina, para su uso en el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan terapias combinadas de enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímero, por ejemplo una hialuronidasa, tal como PEGPH20, y un taxano dirigido a un tumor, tal como paclitaxel unido a albúmina, para su uso en el tratamiento de cánceres. En particular, la terapia combinada proporcionada en la presente memoria se utiliza en el tratamiento de cualquier cáncer caracterizado por tumores sólidos que son impenetrables debido a la capa estromal. Los ejemplos de tales cánceres incluyen cánceres de tumores sólidos, tales como, pero sin limitarse a, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello y otros. La terapia combinada puede incluir adicionalmente un fármaco quimioterapéutico citotóxico adicional, por ejemplo

cualquiera cuya actividad se incremente (p.ej. debido a un aumento del suministro y/o un incremento de la semivida) por uno o ambos agentes antihialuronano, por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y/o el taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico adicional puede ser un análogo de nucleósido, tal como gemcitabina o un derivado del mismo, que exhiba actividades antitumorales directas.

1. Tumores sólidos y terapias dirigidas contra tumores

Los tumores sólidos están formados por células cancerosas y células del estroma (p.ej. fibroblastos y células inflamatorias) que están rodeadas por una matriz extracelular y una red vascular. Las células estromales, los componentes de la matriz extracelular y/o la vasculatura generalmente son anormales en comparación con los presentes en los tejidos normales. Por ejemplo, muchos tumores sólidos tienen un mayor número de fibroblastos en comparación con los tejidos normales. Además, la vasculatura en los tumores sólidos puede mostrar una estructura ramificada o convolucionada en comparación con la vasculatura normal, y mostrar aberraciones estructurales caracterizadas por vasos dilatados, reducción del recubrimiento endotelial y/o vasos comprimidos. Finalmente, el tumor y las células del estroma producen y ensamblan una red compleja de componentes de la matriz extracelular, tales como colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (p.ej., hialuronano) y otras moléculas que forman una masa densa y pueden contribuir a la alta presión intersticial del tumor. La alta presión del fluido intersticial por encima de la presión intravascular en las arteriolas y capilares terminales puede perjudicar la perfusión de líquidos y solutos al intersticio. Por lo tanto, la alta presión intersticial puede dificultar la absorción de productos terapéuticos en los tejidos tumorales, y también puede afectar a las propiedades de crecimiento de las células tumorales para apoyar la proliferación de células tumorales.

Para que las terapias tumorales sean eficaces, los medicamentos deben salir de forma eficaz de los vasos sanguíneos del tumor y penetrar en los tejidos del tumor para llegar a las células cancerosas. La alta presión del fluido intersticial, así como la composición densa y la organización de la matriz extracelular y las células asociadas afectan a la penetración del fármaco. El resultado es que la barrera estromal a menudo impide la penetración de fármacos antitumorales a los tumores, lo que hace que muchos tratamientos convencionales contra el cáncer sean ineficaces.

Por ejemplo, el cáncer de páncreas se encuentra entre los cánceres de tumores sólidos más impenetrables. Como resultado, los cánceres de páncreas, incluyendo el adenocarcinoma ductal pancreático, se caracterizan por una resistencia innata a los agentes quimioterapéuticos convencionales, de modo que la tasa de supervivencia a 5 años es inferior a 5%. La terapia convencional para el cáncer de páncreas es el tratamiento con gemcitabina. La gemcitabina tiene efectos limitados sobre el aumento de la supervivencia del paciente. Por ejemplo, solo aproximadamente una cuarta parte de los pacientes tratados con gemcitabina en monoterapia exhibe un beneficio clínico con una mediana de supervivencia de poco más de 5 meses, que fue solo un mes más que el tratamiento con el agente quimioterapéutico fluorouracilo (5-FU) (Burris et al. (1997) J Clin Oncol, 15:2403-2413). En un entorno coadyuvante donde el tratamiento también se acompaña de cirugía de cáncer de páncreas u otra terapia coadyuvante no quimioterapéutica, la gemcitabina aumentó la supervivencia en dos meses en comparación con los pacientes que se sometieron solo a cirugía (Neuhauser et al. (2008) J. Clin. Oncol. 26: supl. de 20 de mayo; resumen).

Recientemente, se han desarrollado terapias que incluyen un agente terapéutico que puede penetrar la capa estromal y la vasculatura asociada. Los agentes terapéuticos que pueden reducir el estroma, perforar orificios o penetrar de otro modo el estroma se consideran agentes terapéuticos prometedores para muchos cánceres caracterizados por una capa estromal impenetrable. Tales agentes incluyen, por ejemplo, taxanos conjugados con albúmina (Von Hoff et al. (2011) J. Clin. Oncol., 29:4548-54; Frese et al. (2012) Cancer Discovery, 2:260-269), un inhibidor de erizo (Olive et al. (2009) Science, 324:1457-61) e hialuronidasa conjugada con polímero (Provenzano et al. (2012) Cancer Cell, 21:418-429). Cada uno de estos tratamientos también está asociado con un aumento de suministro de agentes quimioterapéuticos no dirigidos al estroma, dando como resultado una potenciación de los efectos antitumorales y una duplicación del tiempo de supervivencia en comparación con el agente quimioterapéutico (p.ej., gemcitabina) en monoterapia.

a. Taxano dirigido a tumores

Los taxanos, tales como paclitaxel (p.ej. Taxol®) y docetaxel (p.ej. Taxotere®) son potentes agentes quimioterapéuticos para su uso en el tratamiento de múltiples tipos de tumores. Los taxanos actúan como inhibidores mitóticos al unirse con alta afinidad a los microtúbulos, interfiriendo de ese modo en la división celular. El resultado es que los taxanos previenen el crecimiento de células tumorales y la metástasis, y pueden causar la muerte celular. El uso terapéutico de taxanos ha sido limitado debido a problemas con la solubilidad y las toxicidades asociadas, la disponibilidad sistémica a largo plazo y la inaccesibilidad al estroma tumoral.

Para superar los problemas asociados con el uso terapéutico de taxanos, se ha desarrollado una formulación de fármaco en nanopartículas dirigida al receptor gp60 constituida por formas de taxanos en partículas unidas a albúmina. Estas incluyen, por ejemplo, paclitaxel unido a albúmina en nanopartículas (nab) (ABI-007, p.ej.,

Abraxane®) y docetaxel unido a albúmina en nanopartículas (ABI-008). Gp60 es el receptor de albúmina en el endotelio vascular. La captación mediada por el receptor de albúmina a través de gp60 da como resultado la asociación con caveolina-1 intracelular que conduce a la invaginación de la membrana celular para formar vesículas transcitóticas (denominadas caveolas) que contienen los constituyentes del plasma unidos del espacio extracelular, transcitosis y depósito extravascular del contenido de las caveolas. Además, la albúmina también se une a SPARC (ácido proteico secretado y rico en cisteína), que es una glicoproteína de la matriz extracelular que se expresa en exceso y se asocia con un mal pronóstico en una variedad de cánceres. El resultado es que se evitan las barreras estromales al suministro de fármacos y se logra una mayor concentración intratumoral del fármaco. El nab-paclitaxel puede alcanzar concentraciones intratumorales más altas y una mayor biodisponibilidad en comparación con el paclitaxel convencional con una base de disolvente (Foote (2007) *Biotechnology Annual Review*, 13:345).

Dado que los taxanos dirigidos a tumores, tales como los taxanos conjugados con albúmina, pueden penetrar y reducir o hundir el estroma, estos agentes se pueden utilizar combinados con otros agentes quimioterapéuticos no dirigidos al estroma para mejorar el suministro de los otros agentes al tumor. El mecanismo para la mejora del suministro se atribuye a la alteración de la arquitectura del estroma y la inducción de la angiogénesis reactiva que conduce a un aumento de la perfusión y suministro del agente quimioterapéutico (véase, p. Frese et al. (2012) *Cancer Discovery*, 2:260-269). Por ejemplo, los estudios han demostrado que el nab-paclitaxel, un taxano conjugado con albúmina, combinado con gemcitabina aumentó casi 2,8 veces la cantidad de gemcitabina en el tumor en comparación con el tratamiento con gemcitabina sola (Von Hoff et al. (2011) *J. Clin. Oncol.*, 29:4548-4554). Los resultados también mostraron que la terapia combinada duplicó el tiempo de supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas (Von Hoff et al. (2011).

El mecanismo para aumentar las cantidades intratumorales de gemcitabina combinada con terapia con nab-paclitaxel se ha atribuido más recientemente a un mecanismo independiente relacionado con una reducción de la citidina desaminasa (Cda) en grupos tratados con nab-paclitaxel (Frese et al. (2012) *Cancer Discovery* 2:260-269). La Cda se expresa de forma ubicua en las células y puede inactivar la gemcitabina por desaminación a su metabolito difluorodesoxiuridina (dFdU). El tratamiento con nab-paclitaxel aumentó las especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que condujo a la degradación de Cda sin ninguna modulación de los niveles de ARNm. Por lo tanto, el tratamiento conjunto con nab-paclitaxel da como resultado una reducción de la desaminación de la gemcitabina y, por lo tanto, estabiliza la gemcitabina, lo que conduce a una elevación de los niveles de gemcitabina intratumoral.

b. Agente anti-hialuronano

Los agentes antihialuronano reducen los niveles de ácido hialurónico (HA, también referido en la presente memoria como hialuronano) al interferir con su síntesis o aumentar su degradación. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano, tales como las enzimas hialuronidasas, son enzimas que menoscaban el ácido hialurónico y lo degradan. El hialuronano es un componente principal de la matriz extracelular de tumores sólidos. El HA es un glicosaminoglicano lineal de alto peso molecular que contiene unidades repetitivas de disacáridos, beta-1,3-N-acetil-D-glucosamina-unida mediante beta-1,4 a ácido D-glucurónico. El HA se produce naturalmente en el organismo y se secreta a niveles extremadamente altos en algunas células cancerosas, incluyendo las células de cáncer de páncreas. Se han notificado aberraciones locales del metabolismo del HA en muchas neoplasias tumorales sólidas, donde los niveles elevados de HA frecuentemente se correlacionan con un mal pronóstico en tumores tales como el carcinoma de mama, gástrico, colorrectal, ovárico, de próstata y de pulmón.

El HA está implicado en un aumento de la captación de agua y presión del líquido intersticial (PLI) en los tejidos enfermos, tales como tumores, lo que da como resultado una vasculatura tumoral comprimida. Por ejemplo, en sitios de inflamación o en un foco tumoral, hay una acumulación rápida de hialuronano, otros componentes de la matriz y agua. Debido a esta rápida acumulación, el sitio enfermo no puede llegar a un equilibrio con su entorno y, por lo tanto, tiene una presión de fluido intersticial más alta que los tejidos normales. Como se discutió anteriormente, la PLI de la mayoría de los tumores sólidos y otros tejidos enfermos asociados con el HA acumulado es elevada, actuando como una barrera para el suministro eficaz de fármacos (Heldin et al. (2004) *Nat Rev Cancer* 4 (10): 806-813). La acumulación de HA también reduce la inhibición de contacto entre las células tumorales (véase, p.ej., Itano et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:3609-3614).

Los agentes anti-hialuronano que inhiben la síntesis de HA o degradan hialuronano, tales como enzimas de degradación de hialuronano, p.ej., hialuronidasas (p.ej. PH20), pueden reducir el hialuronano de manera que el tejido se deshinchas, los vasos sanguíneos se expanden y puede circular más sangre a través del sitio. Esto da como resultado una disminución de la presión del líquido intersticial en el sitio del tejido y un aumento asociado en la perfusión vascular. Por ejemplo, se ha demostrado que la hialuronidasa elimina el HA de los tumores, lo que reduce el volumen tumoral, reduce la presión intersticial intratumoral, disminuye la proliferación de las células tumorales y mejora la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos y los agentes biológicos administrados conjuntamente, al permitir el aumento de la penetración del tumor (véase p.ej. la Solicitud Publicada de los Estados Unidos Núm. 20100003238 y la Solicitud Internacional PCT publicada Núm. WO 2009/128917).

El uso de hialuronidasa, tal como una enzima PH20, para el tratamiento sistémico adolece de problemas asociados con la corta semivida de la enzima. Por ejemplo, la hialuronidasa no modificada típicamente tiene una semivida corta de actividad enzimática en la sangre de minutos, generalmente menos de 5 minutos. Esto significa que tales enzimas generalmente no son adecuadas para su uso en administraciones intravenosas, y otras administraciones, donde su duración de acción es de corta duración. Esto es porque después de la degradación, el sustrato de HA es reemplazado con una semivida de aproximadamente 5 h. Por el contrario, los métodos que aumentan el suministro y/o prolongan la asociación de una hialuronidasa con hialuronano asociado a células (p.ej., hialuronano pericelular asociado a tumor) permiten el tratamiento de tumores ricos en HA. Tales métodos pueden incluir, entre otros, la conjugación de la enzima con un polímero, el uso de una enzima que está aglicosilada o que está modificada para tener una glucosilación reducida, infusión continua de la enzima y/o suministro localizado de la enzima. Por ejemplo, la modificación con polímero de la hialuronidasa, por ejemplo mediante por PEGilación, aumenta la semivida de la enzima a aproximadamente 48 a 72 horas y permite el tratamiento sistémico de tumores ricos en HA (véase p.ej. la Solicitud Publicada de los Estados Unidos Núm. 2010003238 y la Solicitud Internacional PCT publicada Núm. WO 2009/128917). El aumento de la semivida con respecto a la hialuronidasa no modificada permite la eliminación continua de HA, y por lo tanto reduce o disminuye el grado de regeneración de HA en tejidos enfermos, tales como el tumor. Por lo tanto, el mantenimiento de niveles de enzimas plasmáticas mediante conjugación de polímeros puede eliminar el HA, tal como HA tumoral, y también contrarrestar la resíntesis de HA.

Además, las enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímero, tales como una hialuronidasa conjugada con polímero o PH20, por ejemplo PEGPH20, pueden reducir el estroma que rodea las células cancerosas degradando el HA. Tales agentes se pueden utilizar en terapia de agente único para el tratamiento de tumores o en terapia combinada para potenciar el suministro de agentes quimioterapéuticos no dirigidos al estroma tales como gemcitabina. Los resultados de los ensayos clínicos de pacientes con cáncer de páncreas también muestran que el tratamiento con PEGPH20 combinado con gemcitabina produce una duplicación casi total de la supervivencia global en comparación con el tratamiento con gemcitabina sola (Provenzano et al. (2012) Cancer Cell, 21:418-429).

2. Terapia combinada con agente anti-hialuronano y taxano dirigido a un tumor

En la presente memoria se ha encontrado que las terapias combinadas que contienen al menos dos terapias dirigidas contra estroma o tumor diferentes exhiben una eficacia que es mucho mayor que un único agente de direccionamiento al estroma. Por ejemplo, se ha encontrado en la presente memoria que la terapia combinada con taxanos dirigidos a tumores y un agente antihialuronano, en particular un agente antihialuronano capaz de alcanzar el HA pericelular en un tumor durante un tiempo suficiente para reducir los niveles de HA, muestra una mayor eficacia en comparación con el tratamiento individual de cualquiera de los agentes solo. Por ejemplo, la terapia combinada con un taxano dirigido a un tumor y una hialuronidasa conjugada con polímero da como resultado un aumento de la eficacia de más del 25% en comparación con el tratamiento con un solo agente. En una combinación adicional con el fármaco quimioterapéutico no dirigido al estroma gemcitabina, la mediana de supervivencia de un cáncer ilustrativo aumentó en 79% en un modelo de ratón de cáncer de páncreas en comparación con el tratamiento solo con gemcitabina y aumentó en más de 30% en comparación con las terapias existentes que contenían solo un único agente de direccionamiento al estroma. Este aumento de la eficacia se puede traducir en una mejora sustancial en la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas y otros cánceres caracterizados por un estroma impenetrable en comparación con los tratamientos existentes.

Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan métodos que utilizan una terapia combinada que contiene un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano o una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p.ej. hialuronidasa o PH20), y un taxano dirigido a un tumor, tal como un taxano unido a albúmina, para tratar cánceres de estroma tumoral sólido. Por ejemplo, la terapia combinada se puede utilizar para el tratamiento de cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y otros. Las composiciones que contienen el agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p.ej. hialuronidasa o PH20) y un taxano dirigido a un tumor (p.ej. taxano unido a albúmina) se pueden proporcionar por separado en la combinación o se pueden proporcionar en una única composición. Si se proporcionan y se administran por separado, los agentes se pueden administrar de forma simultánea o casi simultánea, sucesiva o intermitente en cualquier orden. Por ejemplo, un agente antihialuronano, p.ej., enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p.ej. hialuronidasa o PH20) y un taxano dirigido a un tumor (p.ej. taxano unido a albúmina) se puede administrar por separado, por lo que se administran casi simultáneamente o se administran con un intervalo de horas o días. El sitio de inyección puede ser el mismo o diferente. Si es diferente, el sitio de inyección puede estar cerca del sitio de inyección del primer agente administrado.

La combinación de los agentes dirigidos al tumor se puede utilizar en conjunto para tratar cánceres de estroma tumoral sólido, o se puede utilizar combinada adicionalmente con otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos. En ejemplos concretos, la combinación de un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p.ej. hialuronidasa o PH20) y un taxano dirigido a un tumor (p.ej. taxano unido

a albúmina) se utiliza en una combinación adicional con un agente quimioterapéutico. El otro agente puede ser un agente de direccionamiento estromal o no estromal. Típicamente, el otro agente es un agente citotóxico no estromal que exhibe actividad antitumoral directa. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico adicional puede ser un agente citotóxico tal como platino (cisplatino o carboplatino), paclitaxel, gemcitabina, docetaxel, vinorelbina, irinotecán y pemetrexed. Típicamente, el agente quimioterapéutico adicional es un análogo de nucleósido, tal como gemcitabina. El tratamiento o agente adicional se pueden administrar por separado o junto con el agente anti-hialuronano, tal como la terapia combinada de la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p.ej. hialuronidasa) y/o un taxano dirigido a un tumor (p.ej. taxano unido a albúmina). El agente adicional se puede administrar por separado en la combinación o proporcionarse en una única composición. Si se proporciona y se administra por separado, el agente adicional se puede administrar simultáneamente o casi simultáneamente, sucesivamente o intermitentemente en cualquier orden con la terapia combinada de agente antihialuronano y/o taxano unido a albúmina. Típicamente, con el fin de efectuar una mejora del suministro del agente adicional, el agente adicional se administra después de la administración de la terapia combinada del agente antihialuronano y/o un taxano unido a albúmina. Debido a la mejora del suministro y la semivida del agente quimioterapéutico adicional, la dosificación del agente adicional para su administración se puede reducir y/o la frecuencia de administración se puede reducir en comparación con los regímenes de dosificación existentes. El resultado es que la terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede dar como resultado una reducción de los efectos secundarios del agente terapéutico adicional co-administrado (p.ej., análogo de nucleósido tal como gemcitabina) en comparación con su administración solo o su administración con cualquiera de un agente antihialuronano, p.ej., una enzima de degradación de hialuronano, o taxano dirigido a un tumor solo.

Las siguientes secciones describen agentes antihialuronano ilustrativos, incluyendo enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímero, taxanos dirigidos a tumores y otros agentes quimioterapéuticos no limitantes ilustrativos para su uso en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. También se describen regímenes de dosificación y métodos ilustrativos para el tratamiento de cánceres de tumores sólidos estromales.

C. Agentes de terapia combinada

En la presente memoria se proporcionan terapias combinadas de agentes antihialuronano, tales como enzimas de degradación de hialuronano, y un taxano dirigido a un tumor, tal como paclitaxel unido a albúmina, para su uso en el tratamiento de cánceres. En particular, en la presente memoria se proporcionan terapias combinadas de una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, por ejemplo una hialuronidasa, tal como PEGPH20, y un taxano dirigido a un tumor, tal como paclitaxel unido a albúmina, para su uso en el tratamiento de cánceres. En particular, la terapia combinada proporcionada en la presente memoria se utiliza en el tratamiento de cualquier cáncer caracterizado por tumores sólidos que son impenetrables debido al HA en la matriz extracelular. Ejemplos de tales cánceres incluyen cánceres de tumores sólidos, tales como, pero sin limitación, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello y otros. La terapia combinada puede incluir adicionalmente un fármaco quimioterapéutico citotóxico adicional, por ejemplo cualquiera cuya actividad se incremente (p.ej. debido al aumento del suministro y/o al aumento de la semivida) por uno o ambos agentes antihialuronano, incluyendo la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, y/o taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico adicional puede ser un análogo de nucleósido, tal como gemcitabina o un derivado del mismo, que exhibe actividades antitumorales directas.

1. Agentes anti-hialuronano

La terapia combinada, que incluye combinaciones y métodos y su uso, proporcionada en la presente memoria contiene un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano, p.ej., una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero. El agente antihialuronano es uno que se puede administrar de forma que alcance su diana y, en particular, alcance una célula tumoral que contiene un HA pericelular elevado. Por ejemplo, el agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano, se puede administrar por infusión continua o inyectarse localmente, puede modificarse con un polímero, o es uno que está aglicosilado o se modifica de forma que está aglicosilado o tenga una disminución de la glicosilación. En un ejemplo, las composiciones y combinaciones proporcionadas contienen una enzima de degradación de hialuronano, en particular una hialuronidasa, tal como una hialuronidasa soluble (p.ej. una PH20 o PH20 truncada), que ha sido modificada por conjugación con una o más moléculas poliméricas (polímero), típicamente para aumentar la semivida de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo, para promover efectos de tratamiento prolongados/sostenidos en un sujeto.

El hialuronano es un componente de la matriz extracelular y un componente principal de la barrera intersticial. Al catalizar la hidrólisis de hialuronano, las enzimas de degradación de hialuronano reducen la viscosidad del hialuronano, aumentando así la permeabilidad del tejido y aumentando la velocidad de absorción de los fluidos administrados por vía parenteral. Como tales, los agentes anti-hialuronano, incluyen enzimas de degradación de hialuronano, tales como hialuronidasas, se han utilizado, por ejemplo, como agentes de diseminación o dispersión junto con otros agentes, fármacos y proteínas para potenciar su dispersión y suministro.

Los agentes antihialuronano reducen los niveles de ácido hialurónico (HA, también referido en la presente memoria como hialuronano) al menoscabar su síntesis o aumentar su degradación. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano, tal como la hialuronidasa, menoscaban el ácido hialurónico (AH) y lo degradan. El tratamiento con agentes que degradan o inhiben la síntesis de hialuronano, tales como las enzimas de degradación de hialuronano, reduce el hialuronano de manera que el tejido se deshinchas, los vasos sanguíneos se expanden y puede circular más sangre a través del sitio. Los ejemplos de tales agentes antihialuronano son agentes que inhiben la síntesis de hialuronano o degradan el hialuronano.

a. Agentes que inhiben la síntesis de hialuronano

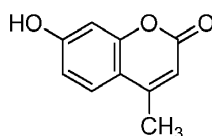
Los agentes antihialuronano incluyen agentes que inhiben la síntesis de hialuronano, tales como agentes que inhiben, reducen o regulan a la baja la expresión de una HA sintasa, inhibidores de la síntesis de HA e inhibidores de tirosina quinasa.

El HA puede sintetizarse mediante tres enzimas que son productos de tres genes de mamíferos relacionados identificados como HA sintasas, denominados *has-1*, *has-2* y *has-3*. Diferentes tipos de células expresan diferentes enzimas HAS y la expresión de los ARNm de HAS se correlaciona con la biosíntesis de HA. Se sabe que el silenciamiento de los genes HAS en las células tumorales inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis. Un agente antihialuronano incluye cualquier agente que inhibe, reduce o regula a la baja la expresión o el nivel de una HA sintasa. Tales agentes son conocidos por los expertos en la técnica o pueden identificarse.

Por ejemplo, la regulación a la baja de una HAS se puede lograr proporcionando oligonucleótidos que hibridan específicamente o interaccionan de otro modo con una o más moléculas de ácido nucleico que codifican una HAS. Por ejemplo, los agentes anti-hialuronano que inhiben la síntesis de hialuronano incluyen moléculas antisentido o efectoras contra un gene *has*. Tal inhibición antisentido o efectora se basa típicamente en la hibridación basada en enlaces de hidrógeno de hebras o segmentos de oligonucleótidos de forma que al menos una hebra o segmento se escinda, se degrade o se haga de otro modo inoperable. En otros ejemplos, se pueden emplear silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), ARNi, ribozimas y ADNzimas. Está en el nivel de un experto en la técnica generar tales construcciones basadas en la secuencia de HAS1 (expuesta en SEQ ID NO: 195), HAS2 (expuesta en SEQ ID NO: 196) o HAS3 (expuesta en SEQ ID NO: 197 o 198). Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto antisentido o efector no tiene que ser 100% complementaria de la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse en uno o más segmentos de manera que los segmentos intermedios o adyacentes no están implicados en el evento de hibridación (p.ej. una estructura de bucle o estructura en horquilla). Generalmente, los compuestos antisentido o efectores tienen al menos 70% de complementariedad de secuencia con una región diana dentro del ácido nucleico diana, por ejemplo, 75% a 100% de complementariedad, tal como 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%. Las moléculas efectoras o antisentido ilustrativas son conocidas en la técnica (véanse p.ej. Chao et al. (2005) J. Biol. Chem., 280:27513-27522; Simpson et al. (2002) J. Biol. Chem., 277:10050-10057; Simpson et al. (2002) Am. J. Path., 161:849; Nishida et al. (1999) J. Biol. Chem., 274:21893-21899; Edward et al. (2010) British J. Dermatology, 162:1224-1232; Udabage et al. (2005) Cancer Res., 65:6139; y Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada Núm. US20070286856).

Otro agente anti-hialuronano ilustrativo que es un inhibidor de la síntesis de HA es la 4-metilumbeliferona (4-MU; 7-hidroxi-4-metilcumarina) o un derivado de la misma. La 4-MU actúa reduciendo el grupo de precursores de UDP-GlcUA que se requiere para la síntesis de HA. Por ejemplo, en células de mamífero, el HA se sintetiza mediante HAS utilizando UDP-ácido glucurónico (UGA) y precursores de UDP-N-acetil-D-glucosamina. La 4-MU interfiere en el procedimiento mediante el cual se genera UGA, agotando así el grupo intracelular de UGA y dando como resultado la inhibición de la síntesis de HA. Se sabe que la 4-MU tiene actividad antitumoral (véanse p.ej. Lokeshwar et al. (2010) Cancer Res., 70:2613-23; Nakazawa et al. (2006) Cancer Chemother. Pharmacol., 57:165-170; Morohashi et al. (2006) Biochem. Biophys. Res. Comm., 345:1454-1459). La administración oral de 4-MU a 600 mg/kg/d reduce las metástasis en 64% en el modelo de melanoma B16 (Yoshihara et al. (2005) FEBS Lett., 579:2722-6). La estructura de 4-MU se muestra a continuación. Asimismo, los derivados de 4-MU exhiben actividad anticancerosa, en particular la 6,7-dihidro-4-metilcumarina y 5,7-dihidro-4-metilcumarina (véase p.ej. Morohashi et al. (2006) Biochem. Biophys. Res. Comm., 345:1454-1459).

4-Metilumbeliferona (4-MU; C₁₀H₈O₃)



Otros agentes antihialuronano ilustrativos son los inhibidores de tirosina quinasa, tales como Leflunomida (Arava), genisteína o erbstatina. La leflunomida también es un inhibidor de la síntesis de pirimidina. La leflunomida es un

medicamento conocido para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) y también es eficaz en el tratamiento del rechazo de aloinjertos y xenoinjertos. Se sabe que el HA contribuye directa o indirectamente a la AR (véase p.ej. Stuhlmeier (2005) J Immunol., 174:7376-7382). Los inhibidores de la tirosina quinasa inhiben la expresión del gen *HAS1* (Stuhlmeier 2005).

5 **b. Enzimas de degradación de hialuronano y enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímero**

10 Los agentes antihialuronano incluyen enzimas de degradación de hialuronano. Las enzimas de degradación de hialuronano, tales como las hialuronidasas, son una familia de enzimas que degradan el hialuronano, que es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Las enzimas de degradación de hialuronano actúan degradando hialuronano mediante la escisión de polímeros de hialuronano, que están compuestos por unidades de disacáridos repetitivas, ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidos mediante la alternancia de enlaces glicosídicos β -1 $\rightarrow$ 4 y β -1 $\rightarrow$ 3. Las cadenas de hialuronano pueden alcanzar repeticiones de aproximadamente 25.000 disacáridos o más de longitud y el tamaño de los polímeros de hialuronano puede variar de aproximadamente 5.000 a 20.000.000 Da. *in vivo*. Al catalizar la hidrólisis del hialuronano, un componente principal de la barrera intersticial, las enzimas de degradación del hialuronano reducen la viscosidad del hialuronano, aumentando así la permeabilidad del tejido.

20 Por consiguiente, las enzimas de degradación de hialuronano para las combinaciones, usos y métodos proporcionados incluyen cualquier enzima que tenga la capacidad de catalizar la escisión de una cadena o polímero de disacárido de hialuronano. En algunos ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano escinde el enlace glicosídico β -1 $\rightarrow$ 4 en la cadena o polímero de hialuronano. En otros ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano cataliza la escisión del enlace glicosídico β -1 $\rightarrow$ 3 en la cadena o polímero de hialuronano.

25 Las enzimas de degradación de hialuronano incluyen hialuronidasas, así como otras enzimas tales como condroitinasas y liasas que tienen la capacidad de escindir hialuronano. Adicionalmente, las enzimas de degradación de hialuronano también incluyen formas solubles de las mismas que se pueden expresar y secretar a partir de las células. Como se describe a continuación, las enzimas de degradación de hialuronano existen en formas unidas a la membrana o solubles que se secretan desde las células. Para los fines de la presente memoria, se proporcionan enzimas de degradación de hialuronano solubles para su uso en las combinaciones, métodos y usos en la presente memoria. Por lo tanto, cuando las enzimas de degradación de hialuronano incluyen un anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y/o están ancladas a la membrana de otra manera o son insolubles, tales enzimas de degradación de hialuronano se pueden proporcionar en forma soluble mediante truncamiento o delección del ancla de GPI para producir la enzima secretada y soluble. Por lo tanto, las enzimas de degradación de hialuronano incluyen variantes truncadas, p.ej. truncadas para eliminar todo o una parte de un ancla de GPI. Son ilustrativas de tales hialuronidasas solubles la hialuronidasa PH20 soluble, tales como las expuestas en (Patente de Estados Unidos Núm. 7.767.429; Publicaciones de los Estados Unidos Núm. US20040268425 o US20100143457.

40 Las enzimas de degradación de hialuronano proporcionadas en la presente memoria también incluyen variantes de cualquier enzima de degradación de hialuronano, tal como cualquier hialuronidasa o hialuronidasa soluble, por ejemplo una PH20, que es conocida por un experto en la técnica o que se describe en la presente memoria. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano pueden contener una o más variaciones en su secuencia primaria, tales como sustituciones, adiciones y/o delecciones de aminoácidos. Una variante de una enzima de degradación de hialuronano generalmente muestra al menos o aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia en comparación con la enzima de degradación de hialuronano que no contiene la variación. Se puede incluir cualquier variación en la enzima de degradación de hialuronano para los fines en la presente memoria siempre que la enzima conserve actividad hialuronidasa, tal como al menos o aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o más de la actividad de una enzima de degradación de hialuronano que no contiene la variación (medida por ensayos *in vitro* y/o *in vivo* bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria). Por ejemplo, son ilustrativas de las enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo aquellas que pueden conjugarse con un polímero, cualquiera expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 2, 4-9, 47, 48, 150-170, 183-189 y 199-210, o cualquiera que muestre al menos o aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4-9, 47, 48, 150-170, 183-189 y 199-210.

60 Se han preparado y aprobado varias formas de enzimas de degradación de hialuronano, que incluyen hialuronidasas, para uso terapéutico en sujetos, incluyendo seres humanos. Por ejemplo, las preparaciones de hialuronidasa derivadas de animales incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada, Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), hialuronidasa testicular bovina e Hydase™ (Prima Pharm Inc.), una hialuronidasa testicular bovina. Hylenex® (Halozyme Therapeutics) es una hialuronidasa recombinante humana producida por células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas genéticamente que contienen ácido nucleico que codifica formas solubles de PH20, denominada rHuPH20 (véanse p.ej., la Publicación de Estados

Unidos Núm. US20040268425; la Patente de Estados Unidos Núm. 7.767.429). Se entiende que cualquier preparación de hialuronidasa se puede utilizar en las combinaciones, métodos y usos proporcionados en la presente memoria, véanse, p.ej., las Patentes de los Estados Unidos Núm. 2.488.564, 2.488.565, 2.676.139, 2.795.529, 2.806.815, 2.808.362, 5.747.027 y 5.827.721 e la Publicación Internacional PCT Núm. WO2005/118799; la

Una descripción no limitante de enzimas de degradación de hialuronano ilustrativas, tales como enzimas hialuronidasa o enzimas hialuronidasas solubles, por ejemplo PH20, para su uso en las combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria se describen a continuación. En general, tales enzimas de degradación de hialuronano incluyen aquellas que están conjugadas con un polímero.

i. Hialuronidasas

Las hialuronidasas son miembros de una gran familia de enzimas de degradación de hialuronano. Hay tres clases generales de hialuronidasas: hialuronidasas de tipo mamífero, hialuronidasas bacterianas e hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Se conocen otras hialuronidasas tales como de avispa de chaqueta amarilla (SEC ID NO: 12 y 13), abeja melífera (SEC ID NO: 14), avispon de cara blanca (SEC ID NO: 15) y avispa de papel (SEC ID NO: 16). Cualquiera de tales enzimas se puede utilizar en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria.

(a) Hialuronidasas de tipo mamífero

Las hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35) son *endo-β-N*-acetil-hexosaminidasas que hidrolizan el enlace glicosídico β-1→4 del hialuronano a diversas longitudes de oligosacáridos tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Estas enzimas tienen actividades tanto hidrolíticas como transglicosidasas, y pueden degradar hialuronano y condroitín sulfatos (CS), generalmente C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, las hialuronidasas de vaca (bovina) (SEC ID NO: 10, 11, 64, 203 y 204 y moléculas de ácido nucleico expuestas en SEC ID NO: 190-192), oveja (*Ovis aries*) (SEC ID NO: 26, 27, 63 y 65, moléculas de ácido nucleico expuestas en SEC ID NO: 66 y 193-194), cerdo (SEC ID NO: 20-21), ratón (SEC ID NO: 17- 19, 32, 205), rata (SEC ID NO: 22-24, 31, 206), conejo (SEC ID NO: 25, 207), orangután (SEC ID NO: 28), mono cinomolgo (SEC ID NO: 29, 202), cobaya (SEC ID NO: 30, 208), chimpancé (SEC ID NO: 101, 199, 200), mono rhesus (SEC ID NO: 102, 201), zorro (SEC ID NO: 209 y 210) y humanas (SEC ID NO: 1-2, 36-39). Las hialuronidasas anteriores incluyen hialuronidasas PH20. Además, la hialuronidasa BH55 es de este tipo como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.747.027 y 5.827.721. Son ilustrativas de hialuronidasas en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria las hialuronidasas solubles.

Las hialuronidasas de mamífero se pueden subdividir adicionalmente en aquellas que son activas en condiciones neutras, que se encuentran predominantemente en extractos de testículos y activas en condiciones ácidas, que se encuentran predominantemente en órganos tales como el hígado. Las hialuronidasas activas en condiciones neutras ilustrativas incluyen PH20, incluyendo pero sin limitarse a, PH20 derivada de diferentes especies tales como ovina (SEC ID NO: 27, 63 y 65), bovina (SEC ID NO: 11 y 64) y humana (SEC ID NO: 1). La PH20 humana (también conocida como SPAM1 o proteína de superficie del espermatozoide PH20), generalmente está anclada a la membrana plasmática a través de un ancla de glucosilfosfatidil inositol (GPI). Está naturalmente involucrada en la adhesión espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración por los espermatozoides de la capa de células del cumulus al digerir el ácido hialurónico.

Además de la PH20 humana (también denominada SPAM1), se han identificado cinco genes similares a la hialuronidasa en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 e HYALP1. HYALP1 es un pseudogen y no se ha demostrado que HYAL3 (SEC ID NO: 38) posea actividad enzimática frente a sustratos conocidos. HYAL4 (polipéptido precursor expuesto en SEC ID NO: 39) es una condroitinasa y exhibe poca actividad frente a hialuronano. HYAL1 (polipéptido precursor expuesto en SEC ID NO: 36) es la enzima prototípica activa en condiciones ácidas y PH20 (polipéptido precursor expuesto en SEC ID NO: 1) es la enzima prototípica activa en condiciones neutras. Las hialuronidasas activas en condiciones ácidas, tales como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor expuesto en SEC ID NO: 37) generalmente carecen de actividad catalítica a pH neutro (es decir pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* por encima de un pH de 4,5 (Frost et al. (1997) Anal. Biochem. 251:263-269). HYAL2 es una enzima activas en condiciones ácidas con una actividad específica muy baja *in vitro*. Las enzimas de tipo hialuronidasa también se pueden caracterizar por las que generalmente están unidas a la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) tal como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilovitch-Miagkova et al., (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100(8):4580-4585), y aquellas que son generalmente solubles tales como HYAL1 humana (Frost et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1):10-15).

PH20

La PH20, como otras hialuronidasas de mamíferos, es una endo- β -N-acetil-hexosaminidasa que hidroliza el enlace glicosídico $\beta 1 \rightarrow 4$ del ácido hialurónico a diversas longitudes de oligosacáridos tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Tiene actividades tanto hidrolíticas como transglicosidasa y puede degradar el ácido hialurónico y los sulfatos de condroitina, tales como C4-S y C6-S. La PH20 participa de forma natural en la adhesión del espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración por el espermatozoide de la capa de células del cumulus al digerir el ácido hialurónico. La PH20 está ubicada en la superficie de los espermatozoides y en el acrosoma derivado de los lisosomas, donde está unido a la membrana acrosómica interna. La PH20 de la membrana plasmática tiene actividad de hialuronidasa solo a pH neutro, mientras que la PH20 de la membrana acrosómica interna tiene actividad a pH neutro y ácido. Además de ser una hialuronidasa, PH20 también parece ser un receptor para la señalización celular inducida por HA y un receptor para la zona pelúcida que rodea al ovocito.

Las proteínas PH20 ilustrativas, incluyendo las formas precursoras y maduras, incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de PH20 humanos (polipéptido precursor expuesto en SEC ID NO: 1, polipéptido maduro expuesto en SEC ID NO: 2), chimpancé (SEQ ID NO: 101, 199, 200), mono Rhesus (SEC ID NO: 102, 201) bovino (SEC ID NO: 11 y 64, 203, 204), conejo (SEC ID NO: 25, 207), PH20 ovina (SEC ID NO: 27, 63 y 65), mono Cynomolgus (SEC ID NO: 29, 202), cobaya (SEC ID NO: 30, 208), rata (SEC ID NO: 31, 206), ratón (SEC ID NO: 32, 205) y zorro (SEC ID NO: 209 y 210).

La PH20 bovina es un polipéptido precursor de 553 aminoácidos (SEC ID NO: 11). El alineamiento de PH20 bovina con PH20 humana muestra solo una débil homología, con múltiples espacios existentes desde el aminoácido 470 hasta los respectivos extremos carboxi debido a la ausencia de un ancla de GPI en el polipéptido bovino (véase p.ej., Frost (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4:427-440). De hecho, no se pronostican anclas claras de GPI en muchas otras especies de PH20 además de las humanas. Por lo tanto, los polipéptidos de PH20 producidos a partir óvidos y bóvidos existen naturalmente como formas solubles. Aunque la PH20 bovina existe unida muy laxamente a la membrana plasmática, no está anclada a través de un ancla sensible a fosfolipasa (Lalancette et al. (2001) Biol Reprod. 65(2):628-636). Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa soluble de testículos bovinos como un extracto para uso clínico (Wydase®, Hyalase®).

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

La PH20 humana exhibe actividad hialuronidasa a pH neutro y ácido. En un aspecto, la PH20 humana es la hialuronidasa activa en condiciones neutras prototípica que generalmente se bloquea en la membrana plasmática a través de un ancla de GPI. En otro aspecto, PH20 se expresa en la membrana acrosómica interna donde tiene actividad hialuronidasa a pH neutro y ácido. Parece que PH20 contiene dos sitios catalíticos en distintas regiones del polipéptido: las regiones del Péptido 1 y del Péptido 3 (Cherr et al., (2001) Matrix Biology 20:515-525). La evidencia indica que la región del péptido 1 de PH20, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 107-137 del polipéptido maduro expuesto en SEC ID NO: 2 y las posiciones 142-172 del polipéptido precursor expuesto en SEC ID NO: 1, es requerida para la actividad de la enzima a pH neutro. Los aminoácidos en las posiciones 111 y 113 (correspondientes al polipéptido de PH20 maduro expuesto en SEC ID NO: 2) dentro de esta región parecen ser importantes para la actividad, ya que la mutagénesis por sustitución de aminoácidos da como resultado polipéptidos de PH20 con actividad hialuronidasa de 3% o actividad hialuronidasa indetectable, respectivamente, en comparación con la PH20 de tipo salvaje (Arming et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814).

La región del Péptido 3, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 242-262 del polipéptido maduro expuesto en SEC ID NO: 2, y las posiciones 277-297 del polipéptido precursor expuesto en SEC ID NO: 1, parece ser importante para actividad enzimática a pH ácido. Dentro de esta región, los aminoácidos en las posiciones 249 y 252 del polipéptido de PH20 maduro parecen ser esenciales para la actividad, y la mutagénesis de cualquiera de los dos da como resultado un polipéptido esencialmente desprovisto de actividad (Arming et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814).

Además de los sitios catalíticos, PH20 también contiene un sitio de unión a hialuronano. La evidencia experimental indica que este sitio está ubicado en la región del Péptido 2, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 205-235 del polipéptido precursor expuesto en SEC ID NO: 1 y las posiciones 170-200 del polipéptido maduro expuesto en SEC ID NO: 2. Esta región está altamente conservada entre hialuronidasas y es similar al motivo de unión a heparina. La mutación del residuo de arginina en la posición 176 (correspondiente al polipéptido de PH20 maduro

expuesto en SEC ID NO: 2) a una glicina da como resultado un polipéptido con solo aproximadamente 1% de la actividad hialuronidasa del polipéptido de tipo salvaje (Arming et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814).

Existen siete sitios de glicosilación potenciales, que incluyen los sitios de glicosilación unidos a N y O, en la PH20 humana en N82, N166, N235, N254, N368, N393 y S490 del polipéptido ilustrado en SEC ID NO: 1. Debido a que los aminoácidos 36 a 464 de SEQ ID NO: 1 parecen contener el dominio hialuronidasa de PH20 humana mínimamente activo, el sitio de glicosilación en S490 no se requiere para la actividad de hialuronidasa apropiada. Existen seis enlaces disulfuro en PH20 humana. Dos enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 del polipéptido ilustrado en SEC ID NO: 1 (correspondiente a los residuos C25 y C316, y C189 y C203 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 2, respectivamente). Se forman otros cuatro enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína C376 y C387; entre C381 y C435; entre C437 y C443; y entre C458 y C464 del polipéptido ilustrado en SEC ID NO: 1 (correspondiente a los residuos C341 y C352; entre C346 y C400; entre C402 y C408; y entre C423 y C429 del polipéptido maduro expuesto en SEQ ID NO: 2, respectivamente).

(b) Hialuronidasas bacterianas

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

Las hialuronidasas ilustrativas de bacterias para su uso en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados incluyen, pero no se limitan a, enzimas de degradación de hialuronano en microorganismos, incluyendo cepas de *Arthrobacter*, *Bdellovibrio*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, y *Streptomyces*. Los ejemplos concretos de tales cepas y enzimas incluyen, pero no se limitan a *Arthrobacter* sp. (cepa FB24) (SEQ ID NO: 67), *Bdellovibrio bacteriovorus* (SEQ ID NO: 68), *Propionibacterium acnes* (SEQ ID NO: 69), *Streptococcus agalactiae* ((SEQ ID NO: 70); 18RS21 (SEQ ID NO: 71); serotipo Ia (SEQ ID NO: 72); y serotipo III (SEQ ID NO: 73)), *Staphylococcus aureus* (cepa COL (SEQ ID NO: 74); cepa MRSA252 (SEQ ID NO: 75 y 76); cepa MSSA476 (SEQ ID NO: 77); cepa NCTC 8325 (SEQ ID NO: 78); cepa bovina RF122 (SEQ ID NO: 79 y 80) y cepa USA300 (SEQ ID NO: 81)), *Streptococcus pneumoniae* ((SEQ ID NO: 82); cepa ATCC BAA-255/R6 (SEQ ID NO: 83); y serotipo 2, cepa D39/NCTC 7466 (SEQ ID NO: 84)), *Streptococcus pyogenes* (serotipo M1 (SEQ ID NO: 85); serotipo M2, cepa MGAS10270 (SEQ ID NO: 86); serotipo M4, cepa MGAS10750 (SEQ ID NO: 87); serotipo M6 (SEQ ID NO: 88); serotipo M12, cepa MGAS2096 (SEQ ID NO: 89 y 90); serotipo M12, cepa MGAS9429 (SEQ ID NO: 91) y serotipo M28 (SEQ ID NO: 92)); *Streptococcus suis* (SEQ ID NO: 93-95); *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601/ES114 (SEQ ID NO: 96)), y la enzima hialuronidasa de *Streptomyces hyaluronolyticus*, que es específica para el ácido hialurónico y no escinde la condroitina o el condroitín sulfato (Ohya, T. y Kaneko, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198:607).

(c) Hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos

Las hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36) son endo- β -glucuronidasas que generan productos finales tetra y hexasacáridos. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces $1 \rightarrow 3$ entre β -D-glucuronato y residuos de N-acetil-D-glucosamina en hialuronato. Las hialuronidasas ilustrativas de sanguijuelas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa de Hirudinidae (p.ej., *Hirudo medicinalis*), Erpobdellidae (p.ej., *Nephelopsis obscura* y *Erpobdella punctata*), Glossiphoniidae (p.ej., *Desserobdella picta*, *Helobdella stagnalis*, *Glossiphonia complanata*, *Placobdella ornata* y *Theromyzon* sp.) y Haemopidae (*Haemopsis marmorata*) (Hovingh et al. (1999) Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 124(3):319-26). Una hialuronidasa ilustrativa de bacterias que tiene el mismo mecanismo de acción que la hialuronidasa de sanguijuela es la de cianobacterias, *Synechococcus* sp. (cepa RCC307, SEQ ID NO: 97).

ii. Otras enzimas de degradación de hialuronano

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

160(30):1849-1857).

La condroitina ABC liasa contiene dos enzimas, condroitin-sulfato-ABC-endoliasa (EC 4.2.2.20) y condroitin-sulfato-ABC exoliasa (EC 4.2.2.21) (Hamai et al. (1997) J Biol Chem. 272(14):9123-30), que degradan una variedad de glicosaminoglicanos de tipo condroitin sulfato y dermatán sulfato. El condroitin sulfato, el condroitin sulfato-proteoglicano y el dermatán sulfato son los sustratos preferidos para la condroitin-sulfato-ABC-endoliasa, pero la enzima también puede actuar sobre el hialuronano a una velocidad menor. La condroitin-sulfato-ABC endoliasa degrada una variedad de glicosaminoglicanos del tipo condroitin sulfato y dermatán sulfato, produciendo una mezcla de oligosacáridos $\Delta 4$ insaturados de diferentes tamaños que finalmente se degradan a tetra y disacáridos insaturados. La condroitin-sulfato-ABC exoliasa tiene la misma especificidad de sustrato pero elimina los residuos disacáridos de los extremos no reductores tanto de condroitin sulfatos poliméricos como de sus fragmentos oligosacáridos producidos por la condroitin-sulfato-ABC endoliasa (Hamai, A. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:9123-9130). Las condroitin-sulfato-ABC-endoliasas y condroitin-sulfato-ABC-exoliasas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, las de *Proteus vulgaris* y *Flavobacterium heparinum* (la condroitin-sulfato-ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se expone en SEQ ID NO: 98 (Sato et al. (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1):39-46).

La condroitina AC liasa (EC 4.2.2.5) es activa sobre los condroitinsulfatos A y C, la condroitina y el ácido hialurónico, pero no es activa en el dermatán sulfato (condroitin sulfato B). Las enzimas condroitinasa AC ilustrativas de las bacterias incluyen, pero no se limitan a, las de *Flavobacterium heparinum* y *Vibrionella parvum*, expuestas en SEQ ID NO: 99 y 100, respectivamente, y *Arthrobacter aureus* (Tkalec et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1):29-35; Ernst et al. (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5):387-444).

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

iii. Enzimas de degradación de hialuronano solubles

En las composiciones, combinaciones, usos y métodos de la presente invención se encuentran enzimas de degradación de hialuronano solubles, que incluyen hialuronidasas solubles. Las enzimas de degradación de hialuronano solubles incluyen cualquier enzima de degradación de hialuronano secretada por las células (p.ej. células CHO) después de la expresión y existen en forma soluble. Tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas solubles, incluyendo hialuronidasas solubles no humanas, incluyendo hialuronidasas solubles animales no humanas, hialuronidasas solubles bacterianas e hialuronidasas humanas, Hyal1, PH20 bovina y PH20 ovina, variantes alélicas de las mismas y otras variantes de las mismas. Por ejemplo, entre las enzimas de degradación de hialuronano solubles se incluyen enzimas de degradación de hialuronano que se han modificado para que sean solubles. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano que contienen un ancla de GPI se pueden hacer solubles mediante el truncamiento y la eliminación de la totalidad o una parte del ancla de GPI. En un ejemplo, la hialuronidasa humana PH20, que normalmente está anclada a la membrana a través de un ancla de GPI, puede hacerse soluble mediante el truncamiento y la eliminación de todo o una parte del ancla de GPI en el extremo C-terminal.

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

Los ejemplos de hialuronidasas incluyen una forma soluble de una PH20 de cualquier especie, tal como una forma soluble de una PH20 de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 29-32, 63-65, 101-102 y 199-210. Tales formas solubles incluyen formas truncadas de las mismas que carecen de toda o una parte del ancla de GPI C-terminal, con tal que la hialuronidasa sea soluble (secretada tras la expresión) y retenga la actividad hialuronidasa. Tales formas también son típicamente formas maduras que, cuando se expresan en una célula, carecen del péptido señal. También se incluyen entre las hialuronidasas solubles las formas solubles de variantes de cualquiera de las PH20 de cualquier especie expuesta en SEC ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 29-32, 63-65, 101-102 y 199-210, o formas truncadas de las mismas, que muestran actividad hialuronidasa. Las variantes incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 29-32, 63-65, 101-102 y 199-210, maduros (p.ej. que carece de la secuencia señal) o formas truncadas de los mismos. Las variantes de aminoácidos incluyen mutaciones conservativas y no conservativas. Se entiende que los residuos que son importantes o que se requieren de otro modo para la actividad de una hialuronidasa, tal como cualquiera de las descritas anteriormente o conocidas por los expertos en la técnica, son

generalmente invariables y no pueden modificarse. Estos incluyen, por ejemplo, residuos de sitios activos. Por lo tanto, por ejemplo, los residuos de aminoácidos 111, 113 y 176 (correspondientes a residuos en el polipéptido de PH20 maduro expuesto en SEC ID NO: 2) de un polipéptido de PH20 humana, o una forma soluble del mismo, son generalmente invariantes y no están alterados. Otros residuos que confieren glicosilación y formación de enlaces disulfuro requeridos para el plegamiento adecuado también pueden ser invariantes.

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

Se pueden producir enzimas de degradación de hialuronano solubles extendidas realizando truncamientos C-terminales en cualquier enzima de degradación de hialuronano anclada naturalmente a GPI de modo que el polipéptido resultante sea soluble y contenga uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia señal de unión al ancla de GPI (véase, p.ej., la Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada US20100143457). Las enzimas de degradación de hialuronano solubles extendidas ilustrativas que están truncadas en el extremo C-terminal pero que conservan una porción de la secuencia señal de unión al ancla de GPI incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de PH20 (esPH20) extendidos de origen de primate, tales como, por ejemplo, polipéptidos de esPH20 humanos y de chimpancé. Por ejemplo, los polipéptidos de esPH20 se pueden preparar por truncamiento C-terminal de cualquiera de los polipéptidos maduros o precursores expuestos en SEC ID NO: 1, 2, 50, 51 o 101, u otras variantes de los mismos, incluyendo el fragmento activo del mismo, en donde el polipéptido resultante es soluble y conserva uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia señal de unión al ancla de GPI. Las variantes incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 50, 51 o 101 que conservan la actividad hialuronidasa. Los polipéptidos de esPH20 proporcionados en la presente memoria pueden truncarse en el extremo C-terminal en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo salvaje, tal como un polipéptido con una secuencia expuesta en SEC ID NO: 1, 2, 50, 51 o 101, con la condición de que el polipéptido esPH20 resultante sea soluble y conserve 1 o más residuos de aminoácidos de la secuencia señal de unión al ancla de GPI.

Típicamente, para su uso en las composiciones, combinaciones y métodos de la presente memoria, se utiliza una enzima de degradación de hialuronano humana soluble, tal como una PH20 humana soluble. Aunque pueden utilizarse enzimas de degradación de hialuronano, tales como PH20, de otros animales, tales preparaciones son potencialmente inmunogénicas, ya que son proteínas animales. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demuestra una sensibilización previa secundaria a los alimentos ingeridos, y dado que se trata de proteínas animales, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización posterior. Por lo tanto, las preparaciones no humanas pueden no ser adecuadas para uso crónico. Si se desean preparaciones no humanas, se contempla en la presente memoria que tales polipéptidos se puedan preparar para tener una menor inmunogenicidad. Tales modificaciones están dentro del nivel de un experto en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, la eliminación y/o la sustitución de uno o más epítospos antigénicos en la molécula.

Las enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo las hialuronidasas (p.ej., PH20), utilizada en los métodos de la presente memoria, se pueden producir recombinantemente o se pueden purificar o purificar parcialmente a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, extractos de testículos. Los métodos para la producción de proteínas recombinantes, que incluyen enzimas de degradación de hialuronano recombinantes, se proporcionan en cualquier parte de la presente memoria y son bien conocidos en la técnica.

(a) PH20 humana soluble

Una hialuronidasa soluble ilustrativa es PH20 humana soluble. Se han producido formas solubles de PH20 humana recombinante y se pueden utilizar en las composiciones, combinaciones y métodos descritos en la presente memoria. La producción de tales formas solubles de PH20 se describe en las Solicitudes de Patente Publicadas de los Estados Unidos. US20040268425; US20050260186, US20060104968, US20100143457 y la Publicación Internacional PCT Núm. WO2009111066. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 soluble, incluyen polipéptidos variantes truncados en el extremo C que incluyen una secuencia de aminoácidos en SEC ID NO: 1 o 2, o tienen al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, o 98% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos incluida en SEC ID NO: 1 o 2, conservan la actividad de hialuronidasa y son solubles. Entre estos

polipéptidos están incluidos los polipéptidos de PH20 solubles que carecen completamente de toda o una porción de la secuencia señal de unión al ancla de GPI.

También se incluyen polipéptidos de PH20 (esPH20) solubles extendidos que contienen al menos un aminoácido del ancla de GPI. Por lo tanto, en lugar de tener un ancla de GPI unida covalentemente al extremo C de la proteína en el RE y estar anclada a la capa extracelular de la membrana plasmática, estos polipéptidos se secretan y son solubles. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal pueden truncarse en el extremo C-terminal en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo salvaje completo, tal como un polipéptido de tipo salvaje completo con una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 o 2, o variantes alélicas o de especie u otras variantes de los mismos.

Por ejemplo, las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos truncados en el extremo C de PH20 humana expuestos en SEC ID NO: 1 que tienen un residuo de aminoácido C-terminal 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de SEQ ID NO: 1. Los polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal pueden truncarse en el extremo C-terminal en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de tipo salvaje completo, tal como un polipéptido de tipo salvaje completo con una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 o 2, o variantes alélicas o de especie u otras variantes de los mismos. Las formas solubles de PH20 humana generalmente incluyen aquellas que contienen los aminoácidos 36-464 expuestos en SEC ID NO: 1. Por ejemplo, cuando se expresa en células de mamífero, la secuencia señal N-terminal de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína se secreta. Por lo tanto, los polipéptidos solubles maduros contienen los aminoácidos 36 a 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de SEQ ID NO: 1. La Tabla 3 proporciona ejemplos no limitantes de polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal ilustrativos, que incluyen polipéptidos de PH20 solubles truncados en el extremo C-terminal. En la Tabla 3 siguiente, se proporcionan las longitudes (en aminoácidos) de los polipéptidos precursores y maduros, y se expone el identificador de secuencia (SEC ID NO) en el que se establecen las secuencias de aminoácidos ilustrativas de los polipéptidos precursores y maduros de las proteínas PH20 truncadas en el extremo C-terminal. El polipéptido de PH20 de tipo salvaje también se incluye en la Tabla 3 como comparación. En particular, son ejemplos de hialuronidasas solubles son polipéptidos de PH20 humana soluble que tienen 442, 443, 444, 445, 446 o 447 aminoácidos de longitud, tal como se expone en cualquiera de SEC ID NO: 4-9, o variantes alélicas o de especie u otras variantes de los mismos.

Tabla 3. Polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal ilustrativos				
Polipéptido	Precursor	Precursor	Maduro	Maduro
	(aminoácidos)	SEQ ID NO	(aminoácidos)	SEQ ID NO
tipo salvaje	509	1	474	2
SPAM1-SILF	500	139	465	183
SPAM1-VSIL	499	106	464	150
SPAM1-IVSI	498	140	463	184
SPAM1-FIVS	497	107	462	151
SPAM1-MFIV	496	141	461	185
SPAM1-TMFI	495	108	460	152
SPAM1-ATMF	494	142	459	186
SPAM1-SATM	493	109	458	153
SPAM1-LSAT	492	143	457	187
SPAM1-TLSA	491	110	456	154
SPAM1-STLS	490	112	455	156
SPAM1-PSTL	489	111	454	155
SPAM1-SPST	488	144	453	188
SPAM1-ASPS	487	113	452	157
SPAM1-NASP	486	145	451	189
SPAM1-YNAS	485	114	450	158
SPAM1-FYNA	484	115	449	159

Tabla 3. Polipéptidos de PH20 truncados en el extremo C-terminal ilustrativos				
Polipéptido	Precursor	Precursor	Maduro	Maduro
	(aminoácidos)	SEQ ID NO	(aminoácidos)	SEQ ID NO
SPAM1-IFYN	483	46	448	48
SPAM1-QIFY	482	3	447	4
SPAM1-PQIF	481	45	446	5
SPAM1-EPQI	480	44	445	6
SPAM1-EEPQ	479	43	444	7
SPAM1-TEEP	478	42	443	8
SPAM1-ETEE	477	41	442	9
SPAM1-METE	476	116	441	160
SPAM1-PMET	475	117	440	161
SPAM1-PPME	474	118	439	162
SPAM1-KPPM	473	119	438	163
SPAM1-LKPP	472	120	437	164
SPAM1-FLKP	471	121	436	165
SPAM1-AFLK	470	122	435	166
SPAM1-DAFL	469	123	434	167
SPAM1-IDAF	468	124	433	168
SPAM1-CIDA	467	40	432	47
SPAM1-VCID	466	125	431	169
SPAM1-GVCI	465	126	430	170

Por ejemplo, las formas solubles de PH20 incluyen, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 4-9, 47, 48, 150-170, 183-189, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de secuencia identidad con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 4-9, 47, 48, 150-170, 183-189 y conserva actividad hialuronidasa.

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

(b) rHuPH20

Se han generado formas solubles recombinantes de PH20 humana y se pueden utilizar en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria. La generación de tales formas solubles de PH20 humana recombinante se describe, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente Publicadas de los Estados Unidos US20040268425; US 20050260186; US20060104968; US20100143457; y la Solicitud PCT Internacional Núm. WO2009111066. Los ejemplos de dichos polipéptidos son los generados por la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1-482 (expuesta en SEC ID NO: 3). Tal molécula de ácido nucleico ilustrativa se expone en SEQ ID NO: 49. El procesamiento postraducciona elimina la secuencia señal de 35 aminoácidos, dejando una PH20 humana recombinante soluble de 447 aminoácidos (SEQ ID NO: 4). Puesto que se produce en el medio de cultivo, existe heterogeneidad en el extremo C de manera que el producto, designado rHuPH20, incluye una mezcla de especies que puede incluir una o más de SEQ ID NOS. 4-9 en diversa abundancia. Típicamente, rHuPH20 se produce en células que facilitan la N-glicosilación correcta para conservar la actividad, tales como las células CHO (p.ej. Células CHO DG44).

iv. Glicosilación de enzimas de degradación de hialuronano

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

Los oligosacáridos unidos a N pertenecen a varios tipos principales (oligomanosa, complejo, híbrido, sulfatado), todos los cuales tienen núcleos (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc- unidos por medio del nitrógeno amídico de residuos de Asn que se encuentran dentro de secuencias -Asn-Xaa-Thr/Ser- (en donde Xaa no es Pro). Se ha informado sobre glicosilación en un sitio -Asn-Xaa-Cys- para la proteína C de coagulación. En algunos casos, una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, puede contener enlaces N-glicosídicos y O-glicosídicos. Por ejemplo, PH20 tiene oligosacáridos ligados a O así como oligosacáridos ligados a N. Existen seis posibles sitios de glicosilación unidos a N en N82, N166, N235, N254, N368, N393 de PH20 humana ilustrados en SEC ID NO 1. Los residuos de aminoácidos N82, N166 y N254 están ocupados por glicanos de tipo complejo, mientras que los residuos de aminoácidos N368 y N393 están ocupados por glicanos de tipo alto contenido de manosa. El residuo de aminoácido N235 está ocupado por aproximadamente 80% de glicanos de tipo alto contenido de manosa y 20% de glicanos de tipo complejo. Como se indicó anteriormente, la glicosilación ligada a O en S490 no es necesaria para la actividad de hialuronidasa.

En algunos ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano para utilizar en las composiciones, combinaciones y/o métodos proporcionados están glicosiladas en uno o en todos los sitios de glicosilación. Por ejemplo, para PH20 humana, o una forma soluble de la misma, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 1 están glicosilados. En algunos ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano están glicosiladas en uno o más sitios de glicosilación nativos. En otros ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano se modifican en uno o más sitios de glicosilación no nativos para conferir glicosilación del polipéptido en uno o más sitios adicionales. En dichos ejemplos, el anclaje de radicales de azúcar adicionales puede potenciar las propiedades farmacocinéticas de la molécula, tales como un aumento de la semivida y/o una mejor actividad.

En otros ejemplos, las enzimas de degradación de hialuronano para su uso en las composiciones, combinaciones y/o métodos proporcionados en la presente memoria son parcialmente desglicosilados (o polipéptidos parcialmente N-glicosilados). Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 solubles parcialmente desglicosilados que conservan la totalidad o una parte de la actividad hialuronidasa de una hialuronidasa completamente glicosilada se pueden utilizar en las composiciones, combinaciones y/o métodos proporcionados en la presente memoria. Las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas ilustrativas incluyen formas solubles de polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados de cualquier especie, tales como cualquiera de los expuestos en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 29-32, 63, 65, 101-102 y 199-210, o variantes alélicas, variantes truncadas u otras variantes de los mismos. Tales variantes son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más con cualquiera de SEQ. ID NOS: 1, 2, 11, 25, 27, 29-32, 63, 65, 101-102 y 199-210, o formas truncadas de los mismos. Las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas proporcionadas en la presente memoria también incluyen hialuronidasas parcialmente desglicosiladas híbridas, de fusión y quiméricas, y productos conjugados de hialuronidasa parcialmente desglicosilados.

Las glicosidasas, o glicósido hidrolasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico para generar dos azúcares más pequeños. Los principales tipos de N-glicanos en vertebrados incluyen glicanos con alto contenido de manosa, glicanos híbridos y glicanos complejos. Existen diversas glicosidasas que dan como resultado solo una desglicosilación parcial de la proteína, incluyendo: EndoF1, que escinde glicanos de tipo alto contenido de manosa y de tipo híbrido; EndoF2, que escinde glicanos de tipo complejo biantenarío; EndoF3, que escinde glicanos complejos biantenarios y más ramificados; y EndoH, que escinde glicanos de tipo alto contenido de manosa y de tipo híbrido. El tratamiento de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, tal como una PH20 soluble, con una o todas estas glicosidasas puede dar como resultado una desglicosilación solo parcial y, por lo tanto, la conservación de la actividad hialuronidasa.

Las enzimas de degradación de hialuronano parcialmente desglicosiladas, tales como las hialuronidasas solubles parcialmente desglicosiladas, pueden producirse por digestión con una o más glicosidasas, generalmente una glicosidasa que no elimina todos los N-glicanos, sino que solo desglicosila parcialmente la proteína. Por ejemplo, el tratamiento de PH20 (p.ej. una PH20 recombinante denominada rHuPH20) con una o todas las glicosidasas anteriores (p.ej. EndoF1, EndoF2 y/o EndoF3) da como resultado una desglicosilación parcial. Estos polipéptidos de PH20 parcialmente desglicosilados pueden exhibir actividad enzimática de hialuronidasa que es comparable a la de los polipéptidos completamente glicosilados. Por el contrario, el tratamiento de PH20 con PNGaseF, una glicosidasa que escinde todos los N-glicanos, da como resultado la eliminación completa de todos los N-glicanos y por lo tanto

hace que PH20 sea enzimáticamente inactiva. Por lo tanto, aunque todos los sitios de glicosilación unidos a N (tales como, por ejemplo, los de los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humana, ilustrados en SEC ID NO: 1) pueden glicosilarse, el tratamiento con una o más glicosidasas puede reducir el grado de glicosilación en comparación con una hialuronidasa que no se digiere con una o más glicosidasas.

Las enzimas de degradación de hialuronano parcialmente desglicosiladas, incluyendo polipéptidos de PH20 solubles parcialmente desglicosilados, pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% del nivel de glicosilación de un polipéptido completamente glicosilado. En un ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 1 están parcialmente desglicosilados, de tal forma que ya no contienen glicanos de alto contenido de manosa o de tipo complejo, sino que contienen al menos un radical N-acetilglicosamina. En algunos ejemplos, 1, 2 o 3 de los sitios de N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166 y N254 de SEQ ID NO: 1 están desglicosilados, es decir, no contienen un radical azúcar. En otros ejemplos, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de SEQ ID NO: 1 están glicosilados. Los residuos de aminoácidos glicosilados contienen mínimamente un radical N-acetilglicosamina. Típicamente, las enzimas de degradación de hialuronano parcialmente desglicosiladas, incluyendo polipéptidos de PH20 solubles parcialmente desglicosilados, exhiben actividad de hialuronidasa que es 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1.000% o más de la actividad hialuronidasa exhibida por el polipéptido completamente glicosilado.

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

La unión covalente u otra unión estable (conjugación) de moléculas poliméricas, tales como polietilenglicol (radical de PEGilación (PEG)), a las enzimas de degradación de hialuronano, tales como hialuronidasas, confiere propiedades beneficiosas a la composición de enzima-polímero de degradación de hialuronano resultante. Tales propiedades incluyen mejora de la biocompatibilidad, extensión de la semivida de proteínas (y actividad enzimática) en la sangre, células y/o en otros tejidos dentro de un sujeto, protección eficaz de la proteína frente a proteasas e hidrólisis, mejora de la biodistribución, mejora de la farmacocinética y/o farmacodinamia y una mayor solubilidad en agua.

Los polímeros ilustrativos que pueden conjugarse con la enzima de degradación de hialuronano, tales como hialuronidasa, incluyen homopolímeros naturales y sintéticos, tales como polioles (es decir, poli-OH), poliaminas (es decir, poli-NH₂) y ácidos policarboxílicos (es decir, poli-COOH), y otros heteropolímeros, es decir, polímeros que comprenden uno o más grupos de acoplamiento diferentes p.ej. un grupo hidroxilo y grupos amina. Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas entre poli(óxidos de alquileo) (POA), tales como polialquilenglicoles (PAG), incluyendo polietilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, PEG-glicidiléteres (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), polietilenglicoles ramificados (PEG), poli(alcohol vinílico) (PAV), poli(etilenimina) (PEI), poliamidoaminas lineales, poli(acrilamida) (PAAm), polidimetilacrilamida (PDAAm), poli(alcohol vinílico) (PAV), policarboxilatos, polivinilpirrolidona (PVP), poli-D,L-aminoácidos, poli(etileno-co-anhídrido maleico), poli(estireno-co-anhídrido maleico), dextranos que incluyen carboximetil-quitosano, dextrina, dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, productos hidrolizados de quitosano, almidones tales como hidroxietil-almidones e hidroxipropil-almidones, glicógeno, agarosas y sus derivados, goma guar, pululano, inulina, goma de xantano, carragenano, pectina, productos hidrolizados de ácido algínico y biopolímeros.

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

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

Las moléculas poliméricas adecuadas para la unión a las enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo

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

Enzimas de degradación de hialuronano solubles PEGiladas

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

Se han descrito en la técnica numerosos reactivos para la PEGilación. Tales reactivos incluyen, pero no se limitan a, PEG activado con N-hidroxisuccinimidilo (NHS), succinimidil mPEG, mPEG₂-N-hidroxisuccinimida, alfa-metilbutanoato de succinimidilo con mPEG, propionato de succinimidilo con mPEG, butanoato de succinimidilo con mPEG, éster de succinimidilo de ácido carboximetil 3-hidroxibutanoico con mPEG, PEG-propionato de succinimidilo homobifuncional, propionaldehído con PEG homobifuncional, butiraldehído con PEG homobifuncional, maleimida con PEG, hidrazida con PEG, carbonato de p-nitrofenilo-PEG, mPEG-carbonato de benzotriazol, propionaldehído con PEG, butiraldehído con mPEG, butiraldehído con mPEG₂ ramificado, acetilo con mPEG, piperidona con mPEG, metilcetona con mPEG, maleimida con mPEG "sin conector", vinil sulfona con mPEG, tiol con mPEG, ortopiridiltoéster con mPEG, ortopiridil sulfuro con mPEG, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona con PEG-NHS, acrilato de PEG-NHS, fluoresceína con PEG-NHS y biotina con PEG-NHS (véanse p.ej., Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6:62-69, 1995; Veronese et al., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; documentos U.S. 5.672.662; U.S. 5.932.462; U.S. 6.495.659; U.S. 6.737.505; U.S. 4.002.531; U.S. 4.179.337; U.S. 5.122.614; U.S. 5.324.844; U.S. 5.446.090; U.S. 5.612.460; U.S. 5.643.575; U.S. 5.766.581; U.S. 5.795.569; U.S. 5.808.096; U.S. 5.900.461; U.S. 5.919.455; U.S. 5.985.263; U.S. 5.990.237; U.S. 6.113.906; U.S. 6.214.966; U.S. 6.258.351; U.S. 6.340.742; U.S. 6.413.507; U.S. 6.420.339; U.S. 6.437.025; U.S. 6.448.369; U.S. 6.461.802; U.S. 6.828.401; U.S. 6.858.736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; WO0500360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 1064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

2. Taxanos y formulaciones de los mismos

La terapia combinada, incluyendo composiciones, combinaciones y métodos y su uso, proporcionada en la presente memoria contiene un taxano. Los taxanos son generalmente poco solubles en agua, lo que ha limitado su uso terapéutico. En las composiciones y combinaciones proporcionadas en la presente memoria, los taxanos se proporcionan como formulaciones que muestran solubilidad en agua. En ejemplos concretos proporcionados en la presente memoria, los taxanos se proporcionan como formulaciones que se dirigen y/o penetran en el estroma o las células de un tumor. Un ejemplo de dicha formulación de taxano es un taxano unido a albúmina.

a. Taxanos

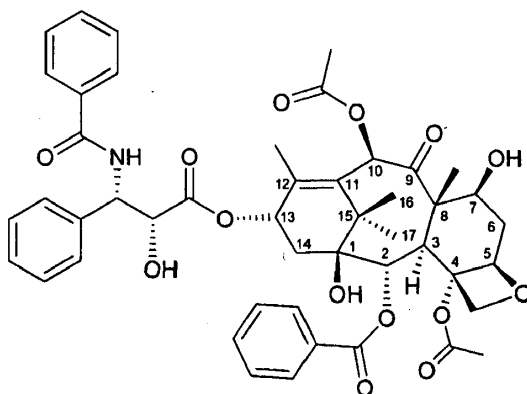
Los taxanos son diterpenos que se producen a partir de plantas del género *Taxus* (tejos). Los taxanos son agentes antimitóticos que se unen a la tubulina y actúan estabilizando la polimerización de microtúbulos, alterando así el equilibrio normal implicado en el ensamblaje y el desmantelamiento de microtúbulos y retardando el funcionamiento de los microtúbulos. Si bien los taxanos promueven la formación de microtúbulos, evitan la despolimerización de la tubulina que forma los microtúbulos del huso mitótico. Los microtúbulos son esenciales para la división celular y las

células expuestas a los taxanos se detienen en la fase premitótica G2 y no se dividen. Estos fármacos interfieren por lo tanto en el proceso de división celular ya que las células tratadas con estos fármacos se mantienen en mitosis. Esto finalmente puede dar como resultado la muerte celular debido a la mitosis no satisfactoria.

5 Los taxanos también generan especies reactivas del oxígeno (ROS), incluyendo acumulación O_2 y H_2O_2 , en células tratadas. La acumulación de ROS se asocia con la actividad citotóxica directa de los taxanos, incluyendo el paclitaxel, así como los efectos de vecindad en las células contiguas (véase p.ej. Alexandre et al. (2007) Cancer Res., 67:3512).

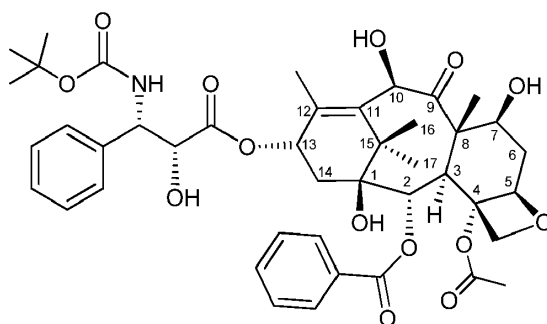
10 Los taxanos para su uso en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria incluyen cualquier compuesto de diterpeno que inhiba la despolimerización de tubulina. En particular, tales taxanos también incluyen cualquiera que dé como resultado la acumulación de ROS en las células tratadas. Los taxanos incluyen aquellos que son formas purificadas de un diterpeno producido naturalmente o aquellos que se sintetizan artificialmente. Los taxanos incluyen aquellos que son no cristalinos y/o amorfos. Los taxanos también pueden incluir formas anhidras de un taxano.

El paclitaxel (taxol) es un diterpenoide natural. Tiene el nombre químico 5 β ,20-epoxi-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -hexahidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato. El Taxol se encuentra en la corteza del tallo del tejo occidental, *Taxus brevifolia*, así como en *T. baccata* y *T. cuspidata*. Primero fue aislado de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia* (Wani et al. (1971) J. Am. Chem. Soc., 93:2325) A. La estructura del núcleo del paclitaxel contiene cuatro anillos (anillos A y C de seis miembros, anillo B de ocho miembros y anillo D de cuatro miembros). La estructura de paclitaxel se expone a continuación, mostrando la numeración utilizando el sistema de numeración convencional para esta clase de fármacos.



25 El paclitaxel se puede preparar mediante métodos semisintéticos a partir de sustancias químicas precursoras llamadas bacatinas, que se obtienen de las agujas y ramas del tejo europeo o del Himalaya. Por ejemplo, el Paclitaxel se puede preparar a partir de bacatina mediante anclaje de grupos protectores a los grupos hidroxilo de la bacatina que se convertirán en los grupos hidroxilo del paclitaxel, convirtiendo la bacatina precursora en paclitaxel, y a continuación eliminando los grupos protectores de los grupos hidroxilo para obtener paclitaxel. Además, el paclitaxel se ha sintetizado recientemente a partir de precursores simples. (Véanse, p.ej., Publicación Internacional PCT Núm. WO93/10076, WO93/16059; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.200.534 Patente de los Estados Unidos Núm. 5.015.744; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.960.790; Nicolaou (1993) Nature 364:464-466; Nicolaou, K.C. y col. (1994) Nature, 367:630-634; y Holton et al. (1994) J. Am. Chem. Soc., 116:1597-1600).

35 El docetaxel (taxotere) es otro taxano ilustrativo para su uso en las combinaciones y composiciones proporcionadas en la presente memoria. Docetaxel tiene el nombre químico 4-acetato 2-benzoato 13-[(2R,3S)-3-[(terc-butoxicarbonil)amino]-2-hidroxi-3-fenilpropanoato de 1,7 β ,10 β -trihidroxi-9-oxo-5 β ,20-epoxitax-11-eno-2 α ,4,13 α -triilo y tiene la estructura que se expone a continuación con la numeración mostrada utilizando el sistema de numeración convencional para esta clase de fármacos.



Docetaxel es un taxano semisintético de segunda generación derivado de un compuesto encontrado en el tejo europeo *Taxus baccata*. El docetaxel es un producto esterificado de la 10-desacetil bacatina III, que se extrae del tejo europeo. Difiere del paclitaxel en dos posiciones en su estructura química: carece de un éster acetato, y existe un éster carbamato de terc-butilo en la cadena lateral de fenilpropionato en lugar de la bencilamida del paclitaxel. Docetaxel, un análogo de paclitaxel, se produce semisintéticamente a partir de 10-desacetil bacatina III, un precursor no citotóxico extraído de las agujas de *Taxus baccata* y esterificado con una cadena lateral sintetizada químicamente (Cortes y Pazdur, 1995, J. Clin. Oncol. 13(10):2643-55).

Los taxanos para su uso en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados en la presente memoria incluyen análogos, derivados y formas de profármacos de paclitaxel o docetaxel. Tales derivados de taxano incluyen aquellos que exhiben una mejor solubilidad en agua en comparación con paclitaxel o el docetaxel. Por ejemplo, los derivados, los análogos y las formas de profármaco del taxano incluyen aquellos en los que las posiciones de los anillos se modifican o se transforman, y en particular cuando la posición 2'- y 7 o 10- se transforma con un grupo adecuado (véase p.ej. Fu et al. (2009) Current Medicinal Chemistry, 16:1-13).

Por ejemplo, los derivados, análogos o formas de profármaco del taxano incluyen, pero no se limitan a, taxoles solubles en agua que tienen varios grupos acilo sustituidos en posición 2'-O (véase p.ej. Patente de Estados Unidos Núm. 4.942.184); taxoles solubles en agua, en los cuales el hidroxilo 2' y/o 7' se transforman con un aminoácido o un compuesto mimético de aminoácido seleccionados (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 4.960.790); 2'-acrilóil taxol sulfonado, ácido 2'-O-acil taxol sulfonado y 2'-benzoil- y 2'-7-dibenzoil taxol sustituido (véanse p.ej. las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.352.805 y 5.411.984); derivados 2' y/o 7-O-éster y 2'- y/o 7-O-carbonato de taxol (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 5.817.840); derivados de taxano formados por conjugación con polímeros tales como polietilenglicol, poli(ácido L-glutámico), poli(ácido L-aspartico) (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 5.977.163); formas de profármaco de taxano que poseen un grupo fosfonooxi en la posición C-7, C-10 y/o 2' de la cadena lateral de un taxano (véase p.ej. el documento WO9414787); sales de 2'-succinilpaclitaxel y 2'-glutarilpaclitaxel (Deutch et al. (1989) J. Med. Chem., 32:788-792); derivados de 2' y 7 aminoácidos de paclitaxel y sus sales (Matthew et al. (1992) J. Med. Chem., 35:145-151); derivados sulfonato (Zhao et al. (1991) J. Nat. Prod., 54:1607-1611; análogos 7-fosfato de paclitaxel (Vyas et al. (1993) Bioorg. Med. Chem., Lett., 3:1357-1360); ésteres de 2' y 7-polietilenglicol de paclitaxel (Greenwald et al. (1995) J. Org. Chem., 60:331-336; Greenwald et al. (1996) J. Med. Chem., 39:424-431); 2' y 7-Fosfonoxifenil-propionato de paclitaxel (Ueda et al. (1993) Bioorg. Med. Chem. Lett., 3:1761-1766); análogos de acetato de 2' y 7-metilpiridinio de paclitaxel (Nicolaou et al. (1994) Angew Chemie, 106:1672-1675); Paloma et al. (1994) Chem. Biol., 1:107-112); profármaco de paclitaxel con ácido málico en la posición 2' (Damen et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett., 8: 427-432); sales de sulfonato de taxanos y, en particular, de taxol (Patente de Estados Unidos Núm. 5.059.699); derivados en los que se une una cadena de acilo para mejorar la solubilidad en lípidos del taxano (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 6,482,850); formas trihidratadas de docetaxel que exhiben una mayor estabilidad que el producto anhidro (véanse p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 6.022.985 y 6.838.569); derivados del taxano C-10, incluyendo los que contienen un radical carbamato en la posición C-10 (Patente de Estados Unidos Núm. 8.138.361); derivados de taxano hidrófobos (publicación de patente de Estados Unidos Núm. US20090263483); y derivados carboxilato que contienen hidrazida de taxanos (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 8,133,888).

b. Taxanos dirigidos tumores o estroma

Los compuestos de taxano proporcionados en las composiciones y combinaciones de la presente memoria se preparan generalmente para dirigirse al tumor o estroma que rodea un tumor. El taxano en las composiciones y combinaciones proporcionadas en la presente memoria también se proporcionan como formulaciones solubilizadas o nanodispersas que exhiben una mejor solubilidad.

El paclitaxel producido naturalmente o semi-sintéticamente (taxol) adolece de problemas tales como baja solubilidad en agua y direccionamiento o localización no específicos. Por ejemplo, los taxanos, incluyendo paclitaxel y docetaxel, son muy poco solubles en agua (menos de 10 µg/ml), y como resultado, no se pueden formular

prácticamente con un medio acuoso para administración intravenosa. Para combatir los problemas de solubilidad en agua, las formulaciones actuales de paclitaxel se formulan para administración intravenosa a pacientes con cáncer en una solución con aceite de ricino polioxietilado (Polyoxyl 35 o Cremophor®) como principal disolvente/tensioactivo, empleando altas concentraciones de etanol empleadas como co-disolvente. Al igual que el paclitaxel, el docetaxel es muy poco soluble en agua. Actualmente, el disolvente/tensioactivo utilizado para disolver docetaxel es polisorbato 80 (Tween 80) (Bissery et al. 1991 *Cancer Res.* 51(18):4845-52; Tomiak *et al.* 1992). El etanol, Cremophor y/o Tween en las formulaciones existentes se asocian con la aparición de reacciones de hipersensibilidad, que pueden incluir erupciones severas en la piel, urticaria, enrojecimiento, disnea, taquicardia y otras.

Adicionalmente, al aumentar la especificidad hacia un tejido canceroso, las moléculas de taxano exhiben menos toxicidad debido a una reducción de los efectos sistémicos o de la exposición. Típicamente, un taxano dirigido a un tumor es un taxano, derivado, análogo o profármaco del mismo que está conjugado o unido directa o indirectamente a través de un conector a un radical de reconocimiento de tumor. El radical de reconocimiento del tumor puede ser un anticuerpo monoclonal, proteína, péptido, lípido o complejo macromolecular que reconoce un marcador o radical específicos del tumor expresados diferencialmente en células cancerosas en comparación con células normales. Las células cancerosas expresan en exceso muchos marcadores o receptores específicos de tumores que se pueden elegir como diana para administrar un taxano.

El taxano dirigido a un tumor se puede proporcionar como micelas, nanopartículas, microesferas, liposomas o formulaciones de hidrogel. Tales formulaciones se pueden utilizar para encapsular ingredientes activos tales como taxanos que pueden exhibir baja solubilidad en medio acuoso. Tales formulaciones son bien conocidas por los expertos en la técnica. En algunos ejemplos, el vehículo de suministro está recubierto o conjugado con el radical de direccionamiento al tumor, tal como un complejo macromolecular, anticuerpo monoclonal, proteína, péptido o lípido. Por lo tanto, en algunos ejemplos, la plataforma de suministro de fármaco encapsula el taxano, y muestra un ligando de direccionamiento u otro recubrimiento polimérico en la superficie para efectuar el direccionamiento al tumor.

Los ejemplos de taxanos dirigidos a tumores y formulaciones de los mismos, contienen un radical de direccionamiento a tumores que es una macromolécula tal como poli-L-glutamato (PGA-TXL, Xyotax; Li et al. (1998) *Cancer Res.*, 58:2404-2409); un anticuerpo monoclonal específico contra un marcador tumoral, tal como los receptores p140 TrkA o p75 (Guillemard y Saragovi (2001) *Cancer Res.*, 61:694) o un anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (es decir, anticuerpo monoclonal anti-EGFR, tal como cetuximab; Safavy et al. (2003) *Bioconjug.*, 14:302-10; Ojima et al. (2002) *J. Med. Chem.*, 45:5620-3), anti-HER2 (Herceptin, trastuzumab, Cirstoiu-Hapca et al. (2010) *J. Control Release*, 144:324-31); un ácido graso poliinsaturado tal como ácido docosahexaenoico (DHA; Bradley et al. (2001) *Clin. Cancer Research*, 7:3229-38), ácido linolénico o ácido linoleico (Kuznetsova et al. (2006) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15:974-7); un péptido tal como un péptido sintético de 7 aminoácidos denominado BBN[7-13] que se une a bombesina/péptido liberador de gastrina (BBN/GRP) de la superficie celular (Safavy et al. (1999) *J. Med. Chem.*, 42:4919-4924), un péptido de 19 aminoácidos dirigido a LRP-1 angiopep-2 (Wen et al. (2011) *Molecular Cancer Therapeutics*, 10 (Sup. 11): Resumen B49), un octapéptido que es escindido por la metaloproteasa de la matriz 2 (MMP2; Yamada et al. (2010) *Cancer Biology and Therapy*, 9:192-203), un péptido RGD (véase p.ej. Zhao et al. (2009) *J. Drug Target*, 17:10-8); proteínas que se dirigen a receptores específicos de tumores tales como receptores de vitaminas, incluyendo la biotina (vitamina H o B-7, folato o ácido fólico, vitamina B12 o riboflavina (véanse p.ej. Chen et al. (2010) *Biconjug. Chem.*, 21:979-987, Li et al. (2011) *International revue of Nanomedicine*, 6:1167-1184); ácido hialurónico (HA) (Auzenne et al. (2007) *Neoplasia*, 9:479-486); transferrina (Sahoo et al. (2004) *Int. J. Cancer*, 112:335-40); y albúmina.

Taxano unido a albúmina

Un ejemplo de un complejo polímero-fármaco soluble es un taxano conjugado con albúmina. La albúmina es un portador natural de moléculas hidrófobas endógenas, tales como vitaminas u hormonas. Además de actuar como portador, la albúmina también facilita la transcitosis endotelial de los constituyentes plasmáticos unidos a la proteína al unirse a gp60 en la superficie de las células endoteliales, lo que afecta la transcitosis mediada por caveolas. La albúmina también puede unirse al ácido proteico secretado rico en cisteína (SPARC, también conocido como osteonectina), que está presente en muchas células tumorales. Por lo tanto, la albúmina promueve la acumulación en células tumorales de fármacos unidos a la albúmina.

La albúmina incluye albúmina de suero humano (HSA) así como albúmina no humana tal como albúmina de suero bovino (BSA). La HSA es una proteína globular altamente soluble de M_r65K y contiene 585 aminoácidos (SEQ ID NO: 211). La HSA es la proteína más abundante en el plasma y representa 70-80% de la presión osmótica coloidal del plasma humano. La secuencia de aminoácidos de HSA contiene un total de 17 puentes disulfuro, un tiol libre (Cys 34) y un solo triptófano (Trp 214).

La albúmina sérica humana (HSA) tiene múltiples sitios de unión hidrófobos (un total de ocho para ácidos grasos, un ligando endógeno de HSA) y se ha demostrado que se une a un conjunto diverso de agentes farmacéuticos,

especialmente compuestos hidrófobos neutros y con carga negativa (Goodman et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, novena edición, McGraw-Hill New York (1996)). Se han propuesto dos sitios de unión de alta afinidad en los subdominios IIA y IIA de HSA, que son bolsas hidrófobas muy alargadas con residuos de lisina y arginina cargados cerca de la superficie que funcionan como puntos de unión para las características del ligando polar (véase, p.ej., Fehske et al., *Biochem. Pharmacol.*, 30, 687-92 (1981), Vorum, *Dan. Med. Bull.*, 46, 379-99 (1999), Kragh-Hansen, *Dan. Med. Bull.*, 37:57-84 (1990), Curry et al., *Nat. Struct. Biol.*, 5, 827-35 (1998), Sugio et al., *Protein. Eng.*, 12, 439-46 (1999), He et al., *Nature*, 358, 209-15 (1992), y Carter et al., *Adv. Protein. Chem.*, 45, 153-203 (1994)). Se ha demostrado que paclitaxel y docetaxel se unen a la HSA (véanse, p.ej., Paal et al., *Eur. J. Biochem.*, 268(7), 2187-91 (2001), Purcell et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1478(1), 61-8 (2000), Altmayer et al., *Arzneimittelforschung*, 45, 1053-6 (1995), Garrido et al., *Rev. Esp. Anestesiología y Reanimación*, 41, 308-12 (1994); y Urien et al., *Invyvest. New Drugs*, 14(2), 147-51 (1996)).

La razón en peso de albúmina con respecto a taxano en la composición es aproximadamente o inferior a 20: 1 o menor, como 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1 o menos, y generalmente es al menos o aproximadamente al menos 9:1. El producto resultante puede generarse para estar libre de disolvente y/o tensioactivo. El taxano está cubierto con la albúmina. Las nanopartículas de taxano/albúmina generalmente tienen un diámetro promedio de no más de 200 nm, y generalmente de 100 nm a 200 nm, tal como un diámetro promedio de 130 nm.

Por ejemplo, los taxanos unidos a albúmina incluyen paclitaxel unido a albúmina (nab) p.ej. Abraxane, American Bioscience, Inc. (Santa Mónica, CA); también descrito en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.439.686 y 6.749.868) o docetaxel unido a albúmina (p.ej. descrito, por ejemplo, en las Publicaciones de las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 20080161382, 20070117744 y 20070082838). La albúmina humana funciona como un polímero tensioactivo que proporciona carga y estabilización estérica a las nanopartículas de paclitaxel para evitar la agregación. La estabilización se logra por el hecho de que la albúmina se adsorbe sobre la superficie de las nanopartículas de paclitaxel, creando así una lámina que funciona como un polímero tensioactivo que evita la agregación de partículas de paclitaxel. La interacción entre el paclitaxel y la albúmina humana es débil y ambas sustancias se disocian libremente después de la reconstitución. Por lo tanto, cuando se reconstituye y se inyecta en el torrente sanguíneo, la concentración de paclitaxel disminuye rápidamente y se cree que las partículas de albúmina se disocian en moléculas de albúmina individuales y a continuación circulan con el paclitaxel aún unido. En particular, se pueden utilizar paclitaxel unido a albúmina (p.ej. nab-paclitaxel o Abraxane) como una suspensión coloidal derivada de una formulación liofilizada de paclitaxel y albúmina de suero humano diluida en solución salina (NaCl al 0,9%). El complejo de partículas de fármaco resultante se estabiliza a un tamaño medio de 130 nm. También se pueden generar y utilizar nanopartículas que contienen otros taxanos, tales como las descritas anteriormente en la presente memoria, y pueden contener las mismas características que las descritas anteriormente.

3. Agente quimioterapéutico adicional (p.ej. análogo de nucleósido)

Opcionalmente, se puede incluir un agente quimioterapéutico adicional cuya actividad se mejora o aumenta mediante la administración conjunta con una o ambas enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímero y/o una formulación de taxano en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden incluir uno o más análogos de nucleósidos, en particular antimetabolitos, en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. Después de que entran en la célula, los análogos de nucleósidos se fosforilan sucesivamente a los nucleósidos 5'-mono-fosfato, di-fosfato y tri-fosfato. Por ejemplo, generalmente, los análogos de nucleósidos se convierten en un compuesto activo por fosforilación del nucleósido en su trifosfato (p.ej. por difosfato quinasas), que a continuación es capaz de competir con un nucleósido fisiológico (p.ej. dCTP) como sustrato para la incorporación al ADN. Por lo tanto, los análogos de nucleósidos imitan los nucleósidos fisiológicos. Una vez incorporado, el análogo es un sustrato ineficaz, lo que detiene la replicación y/o provoca la terminación de la cadena. Véase Sampath et al. (2003), *Oncogene*, 22:9063-9074 para una revisión de análogos de nucleósidos. Dado que los análogos de nucleósidos requieren conversión a una forma activa, generalmente son profármacos que deben ser fosforilados a una forma activa.

Los análogos de nucleósidos para su uso en las composiciones y combinaciones de la presente memoria incluyen análogos de nucleósidos de purina y pirimidina, así como derivados y formas de profármacos de los mismos. Los análogos de nucleósidos de pirimidina incluyen, pero no están limitados a, fluoropirimidina, 5-fluorouracilo (5-FU; fluorouracilo), 5-fluoro-2'-desoxicitidina (FCdR), arabinosilcitosina (ara-C, también denominada citosin arabinosido o citarabina), gemcitabina (2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina), troxacitabina (beta-L-dioxolano citidina, BCH-4556), decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina), azacitidina (4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona), pseudoisocitidina (psi ICR), 5-aza-2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina; 5-aza-2'-desoxi-2'-fluorocitidina; 1-β-D-ribofuranosil-2(1H)-pirimidinona (Zebularina); 2',3'-didesoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina (Emtriva); 2'-ciclocitidina (Ancitabina); 1-β-D-arabinofuranosil-5-azacitosina (Fazarabina o ara-AC); 6-azacitidina (6-aza-CR); 5,6-dihidro-5-azacitidina (dH-aza-CR); N⁴-pentiloxicarbonil-5'-desoxi-5-fluorocitidina (Capecitabina); N⁴-octadecil-citarabina; y ácido elaídico citarabina, y derivados y formas profármaco de los mismos. Los análogos de nucleósidos de purina incluyen, por

ejemplo, fludarabina, cladribina, clofarabina, nelarabina, forodesina, pentostatina y tezacitabina, y derivados y formas profármaco.

Se conocen o pueden generarse otras formas profármaco de análogos de nucleósidos. Por ejemplo, otras formas profármaco incluyen aquellas que se modifican para alterar las propiedades de captación celular y/o resistencia a la desactivación por desaminasa (comentado a continuación). Por ejemplo, tales formas profármaco pueden permitir una mejor absorción oral y/o un direccionamiento tisular aumentado o específico (Li et al. (2008) *Journal Pharm. Science*, 97:1109-1134).

La actividad antitumoral de algunos análogos de nucleósidos ha estado limitada por los bajos niveles citotóxicos que se pueden lograr. Esto se debe principalmente a la inactivación de las enzimas que puede ocurrir en muchos tejidos. Por ejemplo, la inactivación metabólica de algunos análogos de nucleósidos puede ser causada por la desaminación. La desaminación puede ser catalizada por una desaminasa específica de nucleótido, tal como la adenosina desaminasa o la citidina desaminasa (cdA). Por lo tanto, algunos fármacos contra el cáncer son metabolizados por enzimas naturales del organismo tales como la adenosina desaminasa (ADA, EC 3.5.4.4) y la citidina desaminasa (CDA, también denominada citosina nucleósido desaminasa, citidina aminohidrolasa, o EC 3.5.4.5). Estas enzimas funcionan para desaminando nucleósidos de aminopurina y aminopirimidina naturales, respectivamente, en seres humanos y otros organismos. Estas enzimas también convierten los medicamentos contra el cáncer basados en nucleósidos activos en metabolitos inactivos. Por ejemplo, CDA es un componente de la ruta de rescate de pirimidina. Convierte la citidina y la desoxicitidina en uridina y desoxiuridina, respectivamente, mediante desaminación hidrolítica (Cacciamani et al. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 290:285-292; Wentworth y Wolfenden (1978) *Methods Enzymol.* 57:401-407; Wisdom y Orsi (1967) *Biochem. J.* 104:7P). También desamina una cantidad de análogos sintéticos de citosina que son fármacos clínicamente útiles, tales como ara-C y otros, como se analiza a continuación (Eliopoulos et al. (1998) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42:373-378; Kees et al. (1989) *Cancer Res.* 49:3015-3019; Antiviral Chem. Chemother. (1990) 1:255-262). Por ejemplo, la semivida de gemcitabina en plasma es de aproximadamente 10 minutos, debido a la rápida desaminación por la enzima desoxicitidina desaminasa endógena al correspondiente derivado de uracilo (dFdU) (P. G. Johnston et al., *Cancer Chromatography and Biological Response Modifiers*, Annual 16, 1996, Cap. 1, ed. Pinedo H. M. et al.).

Por ejemplo, el fármaco nucleósido de purina arabinosiladenina (fludarabina, ara-A) es desaminado mediante ADA; el compuesto resultante, con el grupo amino original sustituido por hidroxilo, es inactivo como agente antitumoral en comparación con el compuesto original. Del mismo modo, el fármaco arabinosilcitosina (también llamada citarabina Ara-C (o AraC), 4-Amino-1-(β -D-arabinofuranosil)-2(1H)-pirimidinona, citosin arabinósido, o 1-(β -D-Arabinofuranosil)citosina) es degradado metabólicamente por CDA a arabinosiluracilo inactivo. La gemcitabina, decitabina, azacitidina y otros también son inactivados de manera similar. La desaminación de análogos de nucleósidos, tales como los nucleósidos de citosina y sus análogos (p.ej. citarabina y gemcitabina), previene la acumulación de sus derivados tóxicos trifosfato intracelulares que actúan como metabolitos activos.

La conversión de los compuestos de citosina en derivados de uridina generalmente confiere pérdida de actividad terapéutica o adición de efectos secundarios. También se ha demostrado que los cánceres que adquieren resistencia a los fármacos análogos a la citosina a menudo expresan en exceso CDA (Leuk. Res. 1990, 14, 751-754). Las células leucémicas y los tumores sólidos que expresan un alto nivel de CDA pueden manifestar resistencia a los antimetabolitos de citosina y de ese modo limitar la actividad antineoplásica de tales agentes terapéuticos (Biochem. Pharmacol. 1993, 45:1857-1861). La resistencia a análogos de nucleósidos puede requerir mayores dosis, infusiones continuas o administraciones repetidas. Estos efectos pueden conducir a efectos adversos graves, especialmente relacionados con la mielosupresión y la inmunosupresión.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se asocian con la inactivación de enzimas, incluyendo las nucleósido desaminasas. Se sabe que los taxanos inducen ROS intratumorales y, por lo tanto, pueden inactivar la actividad de las nucleósido desaminasas (véase p.ej. Frese et al. (2012) *Cancer Discovery*, 2:260-269).

Por lo tanto, para los fines de la presente memoria, los análogos de nucleósidos ilustrativos para su uso en las combinaciones y composiciones proporcionadas en la presente memoria son aquellos que son sustratos para una desaminasa, y que por lo tanto están inactivados. Por ejemplo, la desaminasa puede ser una citidina desaminasa o una adenosina desaminasa. El nivel intratumoral y la actividad de tales análogos pueden aumentarse enormemente en la terapia combinada con una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y una formulación de taxano. Los ejemplos de dichos análogos de nucleósidos incluyen, pero sin limitación, fludarabina, citarabina, gemcitabina, decitabina y azacitidina o derivados de las mismas. En ejemplos concretos, el análogo de nucleósido es uno que puede tratar tumores sólidos, tales como cáncer de vejiga, mama, pulmón, ovario, páncreas y otros tipos de cáncer.

Cualquiera de los análogos de nucleósidos proporcionados en la presente memoria puede formularse en forma de liposomas, micropartículas, nanopartículas o en forma de productos conjugados de polímeros. Por ejemplo, las formulaciones se pueden preparar para controlar el suministro y/o aumentar las vidas medias de los fármacos

administrados. Por ejemplo, se conocen formulaciones liposómicas ilustrativas (véanse p.ej. las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.736.155 y 8.022.279).

Análogos de nucleósidos ilustrativos

i) Gemcitabina

La gemcitabina (2',2'-difluorodesoxicitidina, dFdC) es un análogo difluorado de la desoxicitidina y, por lo tanto, es un análogo de nucleósido o un antimetabolito. Después de que entra en las células, la fosforilación intracelular por nucleósido monofosfato y difosfato quinasas produce derivados 5'-difosfato (dFdCDP) y 5'-trifosfato (dFdCTP), respectivamente. El trifosfato de gemcitabina actúa como una base fraudulenta, que compite con dCTP para su incorporación al ADN. Si se incorpora al ADN, solo se puede incorporar un nucleótido más antes de que se detenga la elongación de la cadena de ADN. La ADN polimerasa épsilon es incapaz en ese caso de eliminar el nucleótido de gemcitabina y reparar las hebras de ADN en crecimiento (terminación de cadena enmascarada).

La gemcitabina se comercializa como Gemzar®, que es una formulación en polvo liofilizada. Gemzar®, gemcitabina inyectable, USP, contiene Gemcitabina HCl que es monohidrocloreto de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β). Gemzar® se suministra como una formulación intravenosa que contiene 200 mg o 1 g de gemcitabina HCl (expresada como base libre) formulada con manitol (200 mg o 1 g, respectivamente) y acetato de sodio (12,5 mg o 62,5 mg, respectivamente) en forma de polvo liofilizado estéril. El pH de la formulación se puede ajustar mediante la adición de ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio. Gemzar®, un proceso para elaborarlo y los métodos para su uso se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.464.826 y en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.808.614. Actualmente, Gemzar® está aprobado para el tratamiento del cáncer de páncreas, cáncer de mama y cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y está siendo evaluado para el cáncer de ovario. Además, Gemzar® se puede utilizar en el tratamiento del VHC así como en un modulador de la función inmunitaria (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.555.518). Gemzar® se puede administrar por infusión intravenosa a una dosis de aproximadamente 1.000 a 1.250 mg/m² a lo largo de 30 minutos, una vez a la semana durante hasta 7 semanas seguidas de una semana de descanso del tratamiento.

Los derivados sintéticos de la gemcitabina, incluyendo varias formas profármaco, son conocidos (véase, por ejemplo, Ishitsuka et al, Publicación Internacional Núm. WO03/043631; Alexander et al. (2003) J. Med. Chem., 46:4205-4208; Patente de los Estados Unidos Núm. 6.303.569; Guo et al. (2001) Cancer Chemother. Pharmacol., 48:169-176; Publicación Internacional Núm. WO01/21135; Di Stefano et al. (1999) Biochem. Pharmacol., 57:793-799; Guo et al. (1999) J. Org. Chem., 64:8319-8322; Publicación internacional Núm. WO99/33483; Publicación Internacional Núm. WO98/32762; Publicación internacional Núm. WO98/00173; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.606.048; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.594.124; Solicitud de Patente Europea Núm. EP712860; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.521.294; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.426.183; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.401.838; Patente Europea Núm. EP0376518; Solicitud de Patente Europea Núm. EP577303; Solicitud de Patente Europea Núm. EP576230; Chou et al. (1992) Synthesis, 565-570; Richardson et al. (1992) Nucleic Acid Res., 20:1763-1768; Baker et al. (1991) J. Med. Chem., 34:1879-1884; Publicación internacional Núm. WO91/15498; Solicitud de Patente Europea Núm. EP329348; Solicitud de Patente Europea Núm. EP272891).

Los profármacos mejorados ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, elaidato de gemcitabina (también denominado éster 2'-desoxi-2',2'-difluorocidina-5'-ílico de ácido 9(E)-octadecenoico; 2'-desoxi-2',2'-difluoro-5'-O-[9(E)-octadecenoil]citidina; CP-4126; o Núm. Registro CAS 210829-30-4); Sal de meglumina de éster de gemcitabina de ácido azelaico (también denominada sal de meglumina de 1-[5-O-(9-carboxinonanoil)-β-D-arabinofuranosil]citosina); otras sales de éster de gemcitabina de ácido azelaico; y 1-[4-(2-Propilpentanamido)-2-oxo-1H-pirimidin-1-il]-2-desoxi-2,2-difluoro-β-D-ribofuranosa (también denominada LY-2334737). Por ejemplo, CP-4126 es un derivado éster de ácido graso insaturado lipófilo de gemcitabina. Debido a su carácter lipófilo, exhibe un aumento de la captación y acumulación celular, lo que da como resultado una mayor conversión en metabolitos activos.

En comparación con otros análogos de nucleósidos, la gemcitabina y derivados o profármacos de la misma, exhiben una mayor actividad antitumoral, particularmente hacia tumores sólidos. Se ha demostrado la actividad antitumoral de la gemcitabina contra cánceres, en el cáncer de páncreas, el cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, y el cáncer de vejiga.

Un compuesto relativamente hidrofílico, la gemcitabina tiene una capacidad limitada de penetrar las membranas plasmáticas a través de la difusión pasiva. Por lo tanto, se requieren mayores dosis o infusiones. La administración de gemcitabina se ha asociado con algunos efectos secundarios. Las dosificaciones administradas o los tiempos de infusión más largos para mantener los niveles citotóxicos pueden asociarse con mielotoxicidad y otros efectos adversos tales como elevación de la enzima transaminasa hepática, náuseas y vómitos y erupción cutánea.

ii) Citarabina

La citarabina es un análogo de nucleósido que se aisló originalmente de la esponja *Cryptotethya crypta*. La citarabina se fosforila a ara-CTP, que puede competir con dCTP. La ara-CTP también se puede incorporar al ADN e interferir en la polimerización de la cadena y la reparación del ADN. La citabina puede ser inactivada por la citidina desaminasa.

La citarabina se ha utilizado principalmente en cánceres hematológicos. Se han desarrollado derivados sintéticos de citarabina y se ha demostrado que muestran eficacia contra tumores sólidos. Estos incluyen, por ejemplo, gemcitabina (véase más arriba). Por ejemplo, se conocen derivados éster de citarabina. Un ejemplo de dicho derivado es CP-4055, que es el éster de ácido 5'-elaídico de citarabina (véase p.ej. Breistol et al. (1999) Cancer Res., 59:2944).

Debido a los problemas para mantener niveles suficientes de efectos citotóxicos, las dosis administradas o los aumentos de los tiempos de infusión pueden causar efectos secundarios tales como mielosupresión y otras lesiones tisulares específicas.

iii) Decitabina

La decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina, 5-aza-CdR) es un análogo de nucleósido de pirimidina de la citidina. La decitabina se preparó inicialmente por ciclación de isocianatos de peracilglicosilo (PlimL y Sorm (1964) Collect. Czech. Chem. Commun. 29:2576-2577). Se pueden distinguir dos formas isoméricas de decitabina. El anómero β es la forma activa. La decitabina es el ingrediente activo en el producto comercializado DACOGEN™, en forma de un polvo liofilizado estéril para inyectables.

Dentro de la célula, la decitabina se convierte primero en su forma activa, la 5-aza-desoxicitidina fosforilada, por la desoxicitidina quinasa que se sintetiza principalmente durante la fase S del ciclo celular. La afinidad de la decitabina por el sitio catalítico de la desoxicitidina quinasa es similar al sustrato natural, la desoxicitidina (Momparker et al. (1985) Pharmacol Ther 30:287-299). Después de la conversión a su forma de trifosfato por la desoxicitidina quinasa, la decitabina se incorpora al ADN replicante a una velocidad similar a la del sustrato natural, dCTP (Bouchard y Momparker (1983) Mol. Pharmacol. 24:109-114).

Una de las funciones de la decitabina es su capacidad para inhibir específica y potentemente la metilación del ADN. La metilación de la citosina a 5-metilcitosina se produce a nivel de ADN. La incorporación de decitabina a la hebra de ADN tiene un efecto de hipometilación. Cada clase de células diferenciadas tiene su propio patrón de metilación distintivo. Después de la duplicación cromosómica, para conservar este patrón de metilación, la 5-metilcitosina de la hebra parental sirve para dirigir la metilación en la hebra de ADN hija complementaria. La sustitución del carbono en la posición 5 de la citosina por un nitrógeno interfiere en este proceso normal de metilación del ADN. La sustitución de 5-metilcitosina por decitabina en un sitio específico de metilación produce una inactivación irreversible de ADN metiltransferasa, presumiblemente debido a la formación de un enlace covalente entre la enzima y la decitabina (Juttermann et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11797-11801). Al inhibir específicamente la ADN metiltransferasa, la enzima requerida para la metilación, se puede prevenir la metilación aberrante de los genes supresores de tumores.

Los métodos para preparar decitabina, y particularmente el anómero β , son conocidos en la técnica (véase p.ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 3.350.388; la Patente de Estados Unidos Núm. 3.817.980; la Patente de Estados Unidos Núm. 4.209.613; la Solicitud Publicada de Estados Unidos Núm. US20120046457; la Publicación de la Solicitud Internacional Núm. WO2008/101448; Winkley et al. (1970) J Org Chem, 35:491-495; Piskala et al. (1978) Nucleic Acids Research, 1:s109-s114; Ben-Hattar et al. (1986) J Org Chem, 51:3211-3213). La decitabina se puede formular mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. Las formulaciones pueden ser formulaciones líquidas o liofilizadas. Por ejemplo, la decitabina se suministra comúnmente como un polvo liofilizado estéril para inyectables, junto con una sal tamponadora, tal como dihidrogenofosfato de potasio y un modificador de pH, tal como hidróxido de sodio. Por ejemplo, la decitabina es suministrada por SuperGen, Inc., en forma de polvo liofilizado envasado en viales de vidrio de 20 mL, que contienen 50 mg de decitabina, dihidrogenofosfato de potasio monobásico e hidróxido de sodio. Cuando se reconstituye con 10 mL de agua estéril para inyectables, cada mL contiene 5 mg de decitabina, 6,8 mg de KH_2PO_4 y aproximadamente 1,1 mg de NaOH. El pH de la solución resultante es 6,5-7,5. La solución reconstituida se puede diluir adicionalmente a una concentración de 1,0 o 0,1 mg/mL en fluidos de infusión en frío, es decir, Cloruro de Sodio al 0,9%; o Dextrosa al 5%; o glucosa al 5%; o Solución de Ringer con Lactato añadido. Los viales sin abrir normalmente se almacenan en refrigeración (2-8°C, 36-46°F), en el envase original. Las formulaciones líquidas también son conocidas (véase p.ej. Patente de Estados Unidos Núm. 6.982.253).

La decitabina exhibe una corta semivida *in vivo* debido a la desaminación de decitabina a 5-aza-2'-desoxiuridina, que es catalizada por la citidina desaminasa (Chabot et al. (1983) Biochemical Pharmacology 22:1327-1328). La K_m estimada de la decitabina fue de 250 μM para la enzima purificada de hígado humano en comparación con la K_m 12 μM para el sustrato natural, desoxicitidina. La velocidad de desaminación de la desoxicitidina fue aproximadamente

6 veces mayor que la de decitabina por la citidina desaminasa a concentraciones iguales. Debido a la corta semivida, la decitabina se administra muy típicamente a los pacientes mediante inyección, tal como una inyección I.V. en embolada, infusión I.V. continua, o infusión I.V.

- 5 La duración de la infusión I.V. puede estar limitada por la descomposición de decitabina en soluciones acuosas. Existen derivados de decitabina que son más estables en soluciones acuosas (véase *p.ej.* la Patente de Estados Unidos Núm. 7.250.416).

iv) Azacitidina

- 10 La 5-azacitidina (designación del Centro de Servicio Nacional NSC-102816; Número de registro CAS 320-67-2), también conocida como azacitidina, AZA o 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona, es un análogo de decitabina (véase *p.ej.* Hanna et al. (1998) Collect. Czech. Chem. Commun., 63:222-230). Actualmente se comercializa como medicamento VIDAZA®. La azacitidina es un análogo de nucleósido, más específicamente un
15 análogo de citidina. Es un antagonista de su nucleósido natural. Por ejemplo, la única diferencia estructural entre la azacitosina y la citosina es la presencia de un átomo de nitrógeno en la posición 5 del anillo de citosina en la azacitosina en comparación con un carbono en esta posición para la citosina.

- 20 Los métodos para preparar azacitidina, y particularmente los métodos que evitan el uso de agua, son conocidos en la técnica (Patente de los Estados Unidos Núm. 3.350.388; Patente de los Estados Unidos Núm. 8.058.424; Winkley y Robins (1970) J. Org. Chem., 35:491; Piskala y Sorm (1978) Nucl. Ácid. Chem., 1:435; y Vorbrueggen et al. (1981) Chemische Berichte, 114:1234-1255.

- 25 La azacitidina es un sustrato para la citidina desaminasa (véase *p.ej.* Voytek et al. (1977) Cancer Res., 37:1956-61). Para mostrar efectos citotóxicos *in vivo* se requieren altas concentraciones o infusiones continuas. Los efectos secundarios incluyen la disminución del recuento de glóbulos blancos y glóbulos rojos y plaquetas, náuseas, vómitos, fatiga, diarrea, entre otros efectos.

30 D. Métodos de producción de ácidos nucleicos y polipéptidos codificados por enzimas de degradación de hialuronano

- Los polipéptidos de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, expuestos en la presente memoria, se pueden obtener por métodos bien conocidos en la técnica para la purificación de proteínas y la expresión de proteínas recombinantes. Se puede utilizar cualquier método conocido por los expertos en la técnica
35 para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados. Se puede utilizar cualquier método disponible en la técnica para obtener un ADNc completo (es decir, que abarca toda la región codificante), o clon de ADN genómico que codifica una hialuronidasa, tal como de una fuente celular o tisular. Las hialuronidasas solubles modificadas o variantes se pueden diseñar a partir de un polipéptido de tipo salvaje, tal como mediante mutagénesis dirigida al sitio.

- 40 Los polipéptidos se pueden clonar o aislar utilizando cualquier método disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Tales métodos incluyen la amplificación por PCR de ácidos nucleicos y el escrutinio de bibliotecas, incluyendo el escrutinio de hibridación de ácidos nucleicos, el escrutinio basado en anticuerpos y el escrutinio basado en la actividad.

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

- Se pueden unir secuencias nucleotídicas adicionales a una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido, incluyendo secuencias conectoras que contienen sitios de endonucleasas de restricción con el fin de clonar el gen
60 sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de la secuencias de ADN que codifican la proteína central. Además, las secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales se pueden unir operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido. Los ejemplos de tales secuencias incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteínas intracelulares, y secuencias de secreción, por ejemplo secuencias

señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Tales secuencias son conocidas por los expertos en la técnica. También se pueden unir secuencias de residuos de nucleótidos adicionales tales como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteínas a moléculas de ácidos nucleicos que codifican enzimas. Tales regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la absorción de una enzima a células diana específicas, o alteran de otro modo la farmacocinética de un producto de un gen sintético. Por ejemplo, las enzimas se pueden unir a radicales de PEG.

Además, se pueden añadir etiquetas u otros radicales, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, también se pueden unir secuencias de residuos de nucleótidos adicionales tales como las secuencias de bases que especifican una etiqueta epitópica u otro marcador detectable a moléculas de ácido nucleico que codifican enzimas. Los ejemplos de tales secuencias incluyen secuencias de ácidos nucleicos que codifican una etiqueta de His (p.ej., 6xHis, HHHHHH; SEQ ID NO: 54) o Etiqueta Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 55).

Los ácidos nucleicos identificados y aislados se pueden insertar a continuación en un vector de clonación apropiado. Se puede utilizar una gran cantidad de sistemas vector-anfitrión conocidos en la técnica. Los vectores posibles incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vectores debe ser compatible con la célula anfitriona utilizada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como pCMV4, pBR322 o derivados del plásmido pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ilustrado en la presente memoria. La inserción en un vector de clonación se puede realizar, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN a un vector de clonación que tiene extremos cohesivos complementarios. La inserción se puede efectuar utilizando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Alternativamente, se puede producir cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (conectores) en los extremos del ADN; estos conectores ligados pueden contener oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de la proteína se pueden modificar mediante colas homopoliméricas. Las moléculas recombinantes se pueden introducir en células anfitrionas, por ejemplo, mediante transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generan muchas copias de la secuencia del gen.

En realizaciones específicas, la transformación de células anfitrionas con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen aislado de proteína, ADNc o la secuencia de ADN sintetizada permite la generación de copias múltiples del gen. Por lo tanto, el gen se puede obtener en grandes cantidades cultivando transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

1. Vectores y células

Para la expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, tales como cualquier polipéptido de enzima de degradación de hialuronano descrito en la presente memoria, el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la proteína insertada. Las señales transcripcionales y traduccionales necesarias también pueden ser suministradas por el promotor nativo para genes de enzimas y/o sus regiones flanqueantes.

También se proporcionan vectores que contienen un ácido nucleico que codifica la enzima. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores son adecuados para su uso en las mismas.

Se proporcionan células procariotas y eucariotas, que incluyen células endoteliales, que contienen los vectores. Tales células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, Archea, células vegetales, células de insectos y células animales. Las células se utilizan para producir una proteína de las mismas cultivando las células descritas anteriormente en condiciones en las que la proteína codificada es expresada por la célula, y recuperando la proteína expresada. Para los fines de la presente memoria, por ejemplo, la enzima puede secretarse al medio.

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

Se puede utilizar una variedad de sistemas de anfitrión-vector para expresar la secuencia codificante de la proteína. Estos incluyen, pero no se limitan a, sistemas de células de mamíferos infectados con virus (p.ej. virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insectos infectados con virus (p.ej. baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cósmido. Las fortalezas y especificidades de los elementos de expresión de los vectores varían. Dependiendo del sistema de anfitrión-vector utilizado, se puede utilizar cualquiera de una serie de elementos de transcripción y traducción adecuados.

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

En una realización específica, se utiliza un vector que contiene un promotor unido operablemente a ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo de la misma, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (p.ej., un gen de resistencia a antibióticos). Los vectores plasmídicos ilustrativos para la transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA, véase también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor de fago T5 (reconocido por ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión de operador lac doble para proporcionar una expresión altamente regulada y de alto nivel de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión al ribosoma sintético (RBS II) para la traducción eficaz, una secuencia codificante de la etiqueta 6XHis, terminadores transcripcionales t_0 y T1, origen de replicación ColE1 y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de una etiqueta 6xHis en el extremo N o C de la proteína recombinante. Tales plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30 y pQE 31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y proporcionan la expresión de las proteínas marcadas N-terminalmente con 6xHis. Otros vectores plasmídicos ilustrativos para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.952.496; disponible de Novagen, Madison, WI; véase, también la bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Tales plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T71ac, el terminador T7, el

operador lac inducible de *E. coli*, y el gen represor lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, el terminador T7 y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET15b y pET19b (Novagen, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-Tag™ para su uso en la purificación con una columna His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna, la región promotora T7-lac y el terminador T7.

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

2. Expresión

Los polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo polipéptidos de hialuronidasa solubles, se pueden producir mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo métodos *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas deseadas se pueden expresar en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas requeridas de las proteínas, tales como, por ejemplo, las necesarias para la administración y el tratamiento. Los anfitriones de expresión incluyen organismos procarióticos y eucarióticos tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insectos, células de mamíferos, incluyendo líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los anfitriones de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas así como en los tipos de modificaciones postraduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del anfitrión de expresión se puede realizar en base a estos y otros factores, tales como las consideraciones reglamentarias y de seguridad, los costes de producción y la necesidad y los métodos de purificación.

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

Los polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano, tales como los polipéptidos de hialuronidasa solubles, también se pueden utilizar o expresar como fusiones de proteínas. Por ejemplo, se puede generar una fusión enzimática para agregar funcionalidad adicional a una enzima. Los ejemplos de proteínas de fusión enzimática incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia señal, una etiqueta tal como para localización, p.ej. una etiqueta his₆ o una etiqueta myc, o una etiqueta para purificación, por ejemplo, una fusión GST, y una secuencia para dirigir la secreción de proteína y/o la asociación con membrana.

a. Células procariotas

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

Las proteínas, tales como las proporcionadas en la presente memoria, pueden expresarse en el entorno citoplásmico de *E. coli*. El citoplasma es un entorno reductor y para algunas moléculas, esto puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Se pueden utilizar agentes reductores tales como ditioneitol y β -mercaptoetanol y desnaturalizantes, tales como guanidina-HCl y urea, para volver a solubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias que proporciona un entorno oxidante e isomerasas de tipo chaperonina y disulfuro y puede conducir a la producción de proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder se fusiona con la proteína que se va a expresar que dirige la proteína al periplasma. El líder es a continuación eliminado por peptidasas señal dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias líder de direccionamiento periplásmico incluyen el líder pelB del gen de la pectato liasa y el líder derivado del gen de la fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la filtración de la proteína expresada al medio de cultivo. La secreción de proteínas permite una purificación rápida y simple del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no se secretan se pueden obtener a partir del periplasma mediante lisis osmótica. De una manera similar a la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y se pueden utilizar desnaturalizantes y agentes reductores para facilitar la solubilización y el repliegamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y la

solubilidad, típicamente se utilizan temperaturas entre 25°C y 37°C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por lo tanto, si las proteínas requieren glicosilación para su función, se puede agregar glicosilación *in vitro* después de la purificación de las células anfitrionas.

5 b. Células de levadura

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

25 c. Células de insecto

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

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

45 d. Células de mamífero

Los sistemas de expresión de mamíferos se pueden utilizar para expresar proteínas que incluyen polipéptidos enzimáticos de degradación de hialuronano, tales como polipéptidos de hialuronidasa solubles. Las construcciones de expresión pueden transferirse a células de mamífero mediante infección viral tal como adenovirus o mediante transferencia directa de ADN tal como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero incluyen típicamente un sitio cap de ARNm, una caja TATA, una secuencia de iniciación de la traducción (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. También se pueden añadir elementos IRES para permitir la expresión bicistónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Tales vectores a menudo incluyen promotor-potenciadores transcripcionales para la expresión de alto nivel, por ejemplo, el promotor-potenciador de SV40, el promotor de citomegalovirus humano (CMV) y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores-potenciadores están activos en muchos tipos de células. Se pueden utilizar regiones promotoras y potenciadoras de tipo tisular y celular también para la expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, aquellas de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón, albúmina, alfafetoproteína, alfa 1 antitripsina, beta globina, proteína básica de mielina, cadena ligera de miosina 2 y el control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica. Los marcadores seleccionables se

pueden utilizar para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, entre otros, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, aminoglicósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Por ejemplo, la expresión se puede realizar en presencia de metotrexato para seleccionar únicamente aquellas células que expresan el gen DHFR. La fusión con moléculas de señalización de superficie celular como TCR- ζ y Fc ϵ RI- γ puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo sobre la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas celulares para la expresión en mamíferos que incluyen células de ratón, de rata, humanas, de mono, de pollo y de hámster. Las líneas celulares ilustrativas incluyen, pero no se limitan a células CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretora) y otras líneas celulares de mieloma, hibridoma y líneas celulares de heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 y HKB. También están disponibles líneas celulares adaptadas a medios libres de suero que facilitan la purificación de proteínas secretadas de los medios de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, Núm. de Cat. 11619-012) y la línea celular EBNA-1 libre de suero (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-342). También se encuentran disponibles líneas celulares que están adaptadas para crecer en medios especiales optimizados para una máxima expresión. Por ejemplo, las células CHO DG44 están adaptadas para crecer en cultivo en suspensión en un medio químicamente definido, libre de productos de origen animal.

e. Plantas

Se pueden utilizar células vegetales y plantas transgénicas para expresar proteínas tales como las descritas en la presente memoria. Las construcciones de expresión se transfieren típicamente a plantas utilizando transferencia directa de ADN tal como bombardeo de microproyectiles y transferencia mediada por PEG en protoplastos, y con transformación mediada por agrobacterium. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación de la transcripción y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación generalmente se dividen entre anfitriones dicotiledóneos, tales como *Arabidopsis* y tabaco, y anfitriones monocotiledóneos, tales como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores vegetales utilizados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintetasa, el promotor de la ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Los marcadores seleccionables tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa se utilizan a menudo para facilitar la selección y el mantenimiento de las células transformadas. Las células vegetales transformadas se pueden mantener en cultivo como células, agregados (tejido calloso) o regenerarse a plantas completas. Las células vegetales transgénicas también pueden incluir algas modificadas genéticamente para producir polipéptidos de hialuronidasa. Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de la proteína producida en estos anfitriones.

3. Técnicas de purificación

El método para la purificación de polipéptidos, incluyendo polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano (p.ej. polipéptidos de hialuronidasa soluble) u otras proteínas, a partir de células anfitrionas dependerán de las células anfitrionas y los sistemas de expresión elegidos. Para las moléculas secretadas, las proteínas se purifican generalmente a partir de los medios de cultivo después de eliminar las células. Para la expresión intracelular, las células se pueden lisar y las proteínas purificar del extracto. Cuando se utilizan organismos transgénicos tales como plantas y animales transgénicos para la expresión, se pueden utilizar tejidos u órganos como material de partida para preparar un extracto de células lisadas. Adicionalmente, la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en la leche o en los huevos, que se pueden recoger y, si fuera necesario, las proteínas se pueden extraer y purificar adicionalmente utilizando métodos convencionales en la técnica.

Las proteínas, tales como los polipéptidos de hialuronidasa solubles, se pueden purificar utilizando mecanismos de purificación de proteínas conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, SDS-PAGE, cromatografía de fraccionamiento por tamaño y exclusión por tamaño, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como cromatografía de intercambio aniónico. Las técnicas de purificación por afinidad también se pueden utilizar para mejorar la eficacia y la pureza de las preparaciones. Por ejemplo, se pueden utilizar en la purificación por afinidad anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a las enzimas hialuronidasa. También se pueden diseñar construcciones de expresión para agregar una etiqueta de afinidad a una proteína tal como un epítipo myc, fusión GST o His₆ y purificar por afinidad con anticuerpo para myc, resina de glutatión y resina de Ni, respectivamente. La pureza se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica que incluya electroforesis en gel y técnicas de tinción y espectrofotometría. Las composiciones de rHuPH20 purificadas, proporcionadas en la presente memoria, tienen típicamente una actividad específica de al menos 70.000 a 100.000 Unidades/mg, por ejemplo, aproximadamente 120.000 Unidades/mg. La actividad específica puede variar con la modificación, tal como con un polímero.

4. PEGilación de polipéptidos de enzimas de degradación de hialuronano

El polietilenglicol (PEG) se ha utilizado ampliamente en biomateriales, biotecnología y medicina principalmente porque el PEG es un polímero biocompatible, no tóxico, soluble en agua que generalmente no es inmunogénico (Zhao y Harris, ACS Symposium Series 680:458-72, 1997). En el área del suministro de fármacos, los derivados de PEG se han utilizado ampliamente en la unión covalente (es decir, "PEGilación") a proteínas para reducir la

inmunogenicidad, la proteólisis y la depuración renal y para mejorar la solubilidad (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16:157-82, 1995). De forma similar, el PEG se ha unido a fármacos relativamente hidrófobos de bajo peso molecular para mejorar la solubilidad, reducir la toxicidad y alterar la biodistribución. Típicamente, los medicamentos PEGilados se inyectan en forma de soluciones.

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

Se han descrito en la técnica numerosos reactivos para PEGilación. Tales reactivos incluyen, pero no se limitan a, PEG activado con N-hidroxisuccinimidilo (NHS), succinimidil mPEG, mPEG₂-N-hidroxisuccinimida, alfa-metilbutanoato de succinimidilo con mPEG, propionato de succinimidilo con mPEG, butanoato de succinimidilo con mPEG, éster de succinimidilo de ácido carboximetil 3-hidroxibutanoico con mPEG, PEG-propionato de succinimidilo, homobifuncional, propionaldehído con PEG homobifuncional, butiraldehído con PEG homobifuncional, maleimida con PEG, hidrazida con PEG, carbonato de p-nitrofenilo-PEG, carbonato de mPEG-benzotriazol, propionaldehído con PEG, butiraldehído con mPEG, butiraldehído con mPEG₂ ramificado, acetilo con mPEG, piperidona con mPEG, metilcetona con mPEG, maleimida con mPEG "sin conector", vinil sulfona con mPEG, tiol con mPEG, ortopiridilioéster con, ortopiridil disulfuro con mPEG, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona con PEG-NHS, acrilato con PEG-NHS, fluoresceína con PEG-NHS y biotina con PEG-NHS (véase p.ej., Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Veronese et al., J. Bioactive Compatible Polymers 12:197-207, 1997; documentos U.S. 5.672.662; U.S. 5.932.462; U.S. 6.495.659; U.S. 6.737.505; U.S. 4.002.531; U.S. 4.179.337; U.S. 5.122.614; U.S. 5.324.844; U.S. 5.446.090; U.S. 5.612.460; U.S. 5.643.575; U.S. 5.766.581; U.S. 5.795.569; U.S. 5.808.096; U.S. 5.900.461; U.S. 5.919.455; U.S. 5.985.263; U.S. 5.990.237; U.S. 6.113.906; U.S. 6.214.966; U.S. 6.258.351; U.S. 6.340.742; U.S. 6.413.507; U.S. 6.420.339; U.S. 6.437.025; U.S. 6.448.369; U.S. 6.461.802; U.S. 6.828.401; U.S. 6.858.736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; WO0500360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 1064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

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

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

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

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

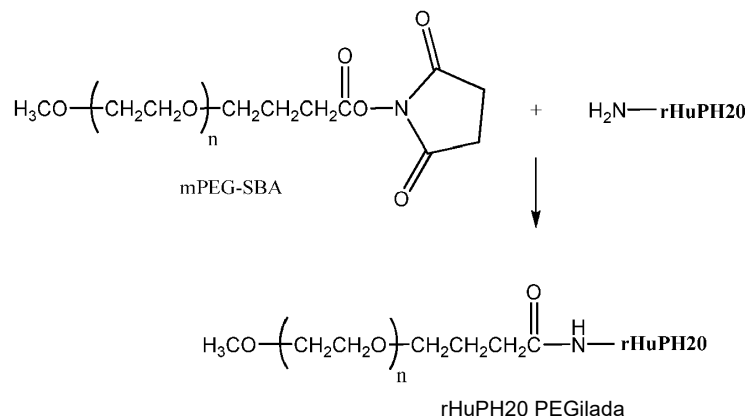
Como ejemplo ilustrativo de la PEGilación de un método ilustrativo para preparar enzimas de degradación de hialuronano PEGiladas, tales como hialuronidasas PEGiladas, se han aplicado aldehídos, succinimidas y carbonatos con PEG para conjugar radicales de PEG, típicamente succinimidil PEG, a rHuPH20.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

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

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

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

Esquema 1



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

Se conocen en la técnica otros métodos para acoplar ésteres de succinimido de derivados de ácido butanoico con PEG, tales como mPEG-SBA-30K (véanse p.ej., los documentos U.S. 5.672.662; U.S. 6.737.505; y U.S. 2004/0235734). Por ejemplo, un polipéptido, tal como una enzima de degradación de hialuronano (p.ej. una hialuronidasa), se puede acoplar a un derivado de PEG activado por NHS mediante reacción en un tampón de borato (0,1 M, pH 8,0) durante una hora a 4°C. La proteína PEGilada resultante se puede purificar mediante ultrafiltración. Alternativamente, la PEGilación de una fosfatasa alcalina bovina se puede realizar mezclando la fosfatasa con mPEG-SBA en un tampón que contiene fosfato de sodio 0,2 M y NaCl 0,5 M (pH 7,5) a 4°C durante 30 minutos. El PEG que no ha reaccionado se puede eliminar por ultrafiltración. Otro método hace reaccionar el polipéptido con mPEG-SBA en agua desionizada a la que se añade trietilamina para elevar el pH a 7,2-9. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante varias horas para completar la PEGilación.

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

E. Composiciones y formulaciones farmacéuticas

En la presente memoria se proporcionan composiciones o combinaciones de un agente antihialuronano y una formulación de taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan composiciones o combinaciones de una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y una formulación de taxano dirigido a un tumor. La formulación de taxano se puede co-formular o co-administrar con composiciones que contienen un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano. Por ejemplo, tales combinaciones y composiciones se pueden utilizar en el tratamiento de cánceres, incluyendo tumores sólidos, como se describe en la presente memoria. En algunos ejemplos, el agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano, se puede proporcionar como una combinación de composiciones separadas que se administran por separado. En otros ejemplos, el agente antihialuronano, por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano, y el taxano se proporcionan en la misma composición y se pueden administrar juntos. Las composiciones o combinación de composiciones se pueden formular para el suministro parenteral (es decir para el suministro sistémico). Por ejemplo, las composiciones o combinación de composiciones se formulan para suministro subcutáneo o para suministro intravenoso.

También se proporcionan en la presente memoria combinaciones y composiciones que contienen un tercer agente que es un agente quimioterapéutico adicional para tratar el cáncer, tal como un análogo de nucleósido u otro antimetabolito (p.ej. gemcitabina o derivado u otro análogo de nucleósido). Los ejemplos de tales agentes se han descrito anteriormente y en otra parte de la presente memoria. El agente quimioterapéutico adicional, por ejemplo un

análogo de nucleósido, se puede co-formular o co-administrar con composiciones que contienen un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano, y/o composiciones que contienen un taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico adicional, por ejemplo un análogo de nucleósido, se puede proporcionar como una composición separada de las combinaciones o composiciones de un agente antihialuronano, por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano y taxano. En otros ejemplos, el análogo de nucleósido se coformula con uno o ambos agentes antihialuronano, por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano y taxano. Por ejemplo, el análogo de nucleósido se coformula con un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano, y se proporciona un taxano dirigido a un tumor como una composición separada. En otro ejemplo, el análogo de nucleósido se coformula con un taxano dirigido a un tumor y se proporciona un agente antihialuronano, por ejemplo, enzima de degradación de hialuronano, como una composición separada. Como ejemplo adicional, el análogo de nucleósido, el agente antihialuronano y el taxano dirigido a un tumor se coformulan juntos en la misma composición. Las composiciones o combinación de composiciones se pueden formular para suministro parenteral (es decir para suministro sistémico). Por ejemplo, las composiciones o combinación de composiciones se formulan para suministro subcutáneo o para suministro intravenoso.

Las composiciones se pueden formular para administración de dosificación única o para administración de dosificación múltiple. Los agentes se pueden formular para administración directa. Las composiciones se pueden proporcionar como una formulación líquida o liofilizada.

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

En general, las composiciones se formulan en forma liofilizada o líquida. Cuando las composiciones se proporcionan en forma liofilizada, se pueden reconstituir inmediatamente antes de su uso mediante un tampón apropiado, por ejemplo, una solución salina estéril. Las composiciones se pueden proporcionar juntas o por separado. Para los fines de la presente memoria, tales composiciones típicamente se proporcionan por separado. El agente antihialuronano, por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano, tal como la hialuronidasa soluble, el taxano dirigido a un tumor y/o un agente quimioterapéutico adicional pueden envasarse como composiciones separadas para la administración conjunta, sucesiva o intermitente. Las combinaciones se pueden envasar en forma de un kit.

Las composiciones se pueden formular para administración por cualquier ruta conocida por los expertos en la técnica, incluyendo inyección intramuscular, intravenosa, intradérmica, intralesional, intraperitoneal, subcutánea, intratumoral, epidural, nasal, oral, vaginal, rectal, tópica, local, ótica, inhalatoria, bucal (p.ej., sublingual), y la administración transdérmica o cualquier ruta. También se contemplan otros modos de administración. La administración puede ser local, tópica o sistémica dependiendo del lugar de tratamiento. La administración local a una zona que necesita tratamiento se puede lograr, por ejemplo, pero sin limitarse a, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante. Las composiciones también se pueden administrar con otros agentes biológicamente activos, ya sea de forma sucesiva, intermitente o en la misma composición. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada incluyendo formulaciones de liberación controlada y dispositivos de liberación controlada, tal como por medio de una bomba.

La ruta más adecuada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores, tales como la naturaleza de la enfermedad, el progreso de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la composición particular que se utiliza. Para los fines de la presente memoria, se desea que un agente antihialuronano, típicamente una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, una taxano dirigido a un tumor y/o un agente quimioterapéutico adicional se administren de manera tal que exista una cantidad o nivel disponible farmacéuticamente en el plasma. Por ejemplo, las composiciones se administran sistémicamente, por ejemplo, mediante administración intravenosa. También se pueden emplear métodos subcutáneos, aunque pueden ser necesarios tiempos de absorción más prolongados para garantizar una biodisponibilidad equivalente en comparación con los métodos intravenosos. Los agentes, tales como una enzima de degradación de hialuronano, un taxano dirigido a un tumor y/o un agente quimioterapéutico adicional (p.ej. análogo de nucleósido) se pueden administrar por diferentes vías de administración. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

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

1. Formulaciones

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

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra una enzima o activador. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma de una administración adecuada al paciente. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un ingrediente activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábica, gelatina, glucosa, melazas, polivinilpirrolidina, celulosa y derivados de las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes de este tipo conocidos por los expertos en la técnica. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades mínimas de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH, por ejemplo, acetato, citrato sódico, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina y otros agentes similares.

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

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

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

a. Inyectables, soluciones y emulsiones

En la presente memoria se contempla administración parenteral, caracterizada generalmente por inyección, ya sea por vía subcutánea, intramuscular, intratumoral, intravenosa o intradérmica. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua,

solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas que se van a administrar también pueden contener un activador en forma de un disolvente tal como agentes tamponadores del pH, sales de iones metálicos u otros tampones de este tipo. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otras cantidades mínimas de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad y otros agentes tales como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. También se contempla en la presente memoria la Implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de modo que se mantenga un nivel constante de dosificación (véase, p.ej. la Patente de los Estados Unidos Núm. 3.710.795). El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones parenterales depende en gran medida de la naturaleza específica de las mismas, así como de la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

Por ejemplo, una formulación estabilizada convencional de una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como una hialuronidasa soluble conjugada con polímero como se proporciona en la presente memoria, se formula con uno o más de EDTA, NaCl, CaCl₂, histidina, lactosa, albúmina, Pluronic® F68, TWEEN® y/u otro detergente u otros agentes similares. Por ejemplo, las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden contener uno o más tampones de pH (tales como, por ejemplo, histidina, fosfato u otros tampones), o tampón ácido (tal como acetato, citrato, piruvato, Gly-HCl, succinato, lactato, maleato u otros tampones), modificador de la tonicidad (tal como, por ejemplo, un aminoácido, polialcohol, NaCl, trehalosa, otras sales y/o azúcares), estabilizador, agente quelante, tal como ácido etilendiaminotetraacético, etilendiaminotetraacetato o EDTA de calcio, captador de oxígeno, tal como metionina, ácido ascórbico/ascorbato, ácido cítrico/citrato o albúmina y/o un conservante, tal como un conservante que contiene un anillo aromático (p.ej. fenol o cresol). Los estabilizadores ilustrativos que son útiles para las composiciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano incluyen detergentes, tales como polisorbatos y proteínas tales como albúmina de suero humano. Las concentraciones ilustrativas de albúmina de suero que son útiles en las composiciones de la presente memoria incluyen 0,1 mg/mL a 1 mg/ml, tal como al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/mL o 1 mg/ml, pero puede ser más o menos. Los polisorbatos también pueden estar presentes en las composiciones a, por ejemplo, concentraciones de o aproximadamente entre 0,001% y 0,1%, tal como al menos aproximadamente o al menos o aproximadamente 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005%, 0,006%, 0,007%, 0,008%, 0,009%, 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09% o 0,1%. También puede estar presente un agente quelante de metales, tal como EDTA de calcio (CaEDTA), tal como, por ejemplo, a concentraciones de entre aproximadamente 0,02 mM y 20 mM, tal como al menos aproximadamente o al menos o aproximadamente 0,02 mM, 0,04 mM, 0,06 mM, 0,08 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM o más. El pH y la osmolaridad de las composiciones pueden ser ajustadas por un experto en la técnica para optimizar las condiciones para la actividad y la estabilidad deseadas de la composición. En algunos ejemplos, las composiciones proporcionadas en la presente memoria tienen una osmolaridad de entre 100 mOsm/kg y 500 mOsm/kg, tal como al menos o al menos aproximadamente o de o aproximadamente 100 mOsm/kg, 120 mOsm/kg, 140 mOsm/kg, 160 mOsm/kg, 180 mOsm/kg, 200 mOsm/kg, 220 mOsm/kg, 240 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 300 mOsm/kg, 320 mOsm/kg, 340 mOsm/kg, 360 mOsm/kg, 380 mOsm/kg, 400 mOsm/kg, 420 mOsm/kg, 440 mOsm/kg, 460 mOsm/kg, 500 o más mOsm/kg, y un pH de entre o aproximadamente entre 6 y 8, tales como 6 y 7,4, por ejemplo de o aproximadamente de 6, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 u 8.

Generalmente, el NaCl se proporciona en formulaciones que contienen una enzima de degradación de hialuronano de la presente memoria, por ejemplo, en una cantidad que es o es de aproximadamente 100 mM a 150 mM o más. Por ejemplo, una formulación ilustrativa puede contener, o contener aproximadamente, histidina 10 mM y/o contener, o contener aproximadamente NaCl 130 mM. Otras formulaciones pueden contener adicionalmente o alternativamente lactosa, por ejemplo, a o aproximadamente a 13 mg/mL o aproximadamente 13 mg/ml. Adicionalmente, puede estar presente en la formulación un agente antibacteriano o antifúngico, incluyendo, pero no limitado a timerosal. Las formulaciones pueden contener adicionalmente Albúmina, Pluronic® F68, TWEEN® y/u otro detergente. Las formulaciones se proporcionan a un pH que es o es de aproximadamente 6,0 a 7,4, tal como 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 o 7,4, generalmente el pH es o es aproximadamente 6,5. Las formulaciones concentradas de una hialuronidasa soluble modificada para su uso en la presente invención generalmente se diluyen en una solución salina u otra solución salina tamponada antes de la administración para mantener la concentración de sal apropiada.

Los inyectables están diseñados para administración local y sistémica. Para los fines de la presente memoria, se desea la administración local para la administración directa al intersticio afectado asociado con hialuronano acumulado o en exceso. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos estériles solubles en seco, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un disolvente inmediatamente antes de su uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para ser combinados con un vehículo inmediatamente antes del uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas. Si se administran por vía intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato

(PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables utilizados en las preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen Inyectable de Cloruro de Sodio, Inyectable de Ringer, Inyectable de Dextrosa Isotónica, Inyectable de Agua Estéril, Dextrosa e Inyectable de Ringer con Lactato añadido. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijados de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Los agentes antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas se pueden añadir a preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiples, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido metil- y propil-p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen hidrocloreto de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen polisorbato 80 (TWEEN 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles con agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste del pH.

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

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

b. Polvos liofilizados

Tienen interés en la presente invención los polvos liofilizados, que pueden reconstituirse para su administración en forma de soluciones, emulsiones y otras mezclas. También se pueden reconstituir y formular en forma de sólidos o geles. Los polvos liofilizados se pueden preparar a partir de cualquiera de las soluciones descritas anteriormente.

El polvo estéril liofilizado se prepara disolviendo un compuesto de un agente antihialuronano que es una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, y/o un segundo agente en una solución tampón. La solución tampón puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparada a partir del polvo. La posterior filtración en condiciones estériles de la solución seguida de liofilización en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica proporciona la formulación deseada. Brevemente, el polvo liofilizado se prepara disolviendo un excipiente, tal como dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, en un tampón adecuado, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón semejante conocido por los expertos en la técnica. A continuación, se añade una enzima seleccionada a la mezcla resultante, y se agita hasta que se disuelva. La mezcla resultante se filtra en condiciones estériles o se trata para eliminar los productos particulados y para asegurar la esterilidad, y se distribuye en viales para la liofilización. Cada vial contendrá una dosis única (1 mg - 1 g, generalmente 1-100 mg, tal como 1-5 mg) o múltiples dosis del compuesto. El polvo liofilizado se puede almacenar en condiciones apropiadas, tal como de aproximadamente 4°C a temperatura ambiente.

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

c. Administración tópica

Las mezclas tópicas se preparan como se describe para la administración local y sistémica. Las mezclas resultantes pueden ser una solución, suspensión, emulsión o similar y se formulan como cremas, geles, ungüentos, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendajes, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para administración tópica.

Los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden formular en forma de

aerosoles para aplicación tópica, tal como mediante inhalación (véanse, p.ej., las Patentes de los Estados Unidos Núm. 4.044.126, 4.414.209 y 4.364.923, que describen aerosoles para el suministro de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para administración al tracto respiratorio pueden estar en forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o combinado con un portador inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación típicamente tendrán diámetros de menos de 50 micras, preferiblemente menos de 10 micras.

Los compuestos se pueden formular para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica en la piel y las membranas mucosas, tal como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y para su aplicación al ojo o para la aplicación intracisternal o intraespinal. Se contempla la administración tópica para el suministro transdérmico y también para la administración a los ojos o a la mucosa, o para terapias de inhalación. También se pueden administrar soluciones nasales del compuesto activo solo o combinado con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se proporcionan formulaciones adecuadas para administración transdérmica. Se pueden proporcionar en cualquier formato adecuado, tal como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Tales parches contienen el compuesto activo en una solución acuosa opcionalmente tamponada de, por ejemplo, una concentración de 0,1 a 0,2 M con respecto al compuesto activo. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica también se pueden suministrar mediante iontoforesis (véase, p.ej., Pharmaceutical Research 3(6), 318 (1986)) y típicamente adoptan la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada del compuesto activo.

d. Composiciones para otras vías de administración

Dependiendo de la afección tratada, también se contemplan en la presente memoria otras vías de administración, tales como la aplicación tópica, los parches transdérmicos, la administración oral y rectal. Por ejemplo, las formas de dosificación farmacéutica para administración rectal son supositorios rectales, cápsulas y comprimidos para efecto sistémico. Los supositorios rectales incluyen cuerpos sólidos para inserción en el recto que se funden o ablandan a temperatura corporal liberando uno o más ingredientes farmacológicamente o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de theobroma), glicerina-gelatina, carbowax (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Se pueden utilizar combinaciones de las diversas bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales se pueden preparar mediante el método comprimido o mediante moldeado. El peso típico de un supositorio rectal es de aproximadamente 2 a 3 g. Los comprimidos y las cápsulas para administración rectal se fabrican utilizando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y mediante los mismos métodos que para las formulaciones para administración oral.

Las formulaciones adecuadas para administración rectal se pueden proporcionar como supositorios de dosis unitaria. Estos se pueden preparar mezclando el compuesto activo con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y a continuación dando forma a la mezcla resultante.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p.ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p.ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (p.ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p.ej., almidón de patata o sal sódica de glicolato de almidón); o agentes humectantes (p.ej., laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por medio de métodos bien conocidos en la técnica.

Las formulaciones adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen, por ejemplo, grageas que contienen el compuesto activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; y pastillas que contienen el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar mediante formulaciones de liberación controlada y/o dispositivos de suministro (véanse, p.ej., las Patentes de los Estados Unidos Núm. 3.536.809; 3.598.123; 3.630.200; 3.845.770; 3.847.770; 3.916.899; 4.008.719; 4.687.660; 4.769.027; 5.059.595; 5.073.543; 5.120.548; 5.354.556; 5.591.767; 5.639.476; 5.674.533 y 5.733.566).

Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden utilizar para administrar composiciones seleccionadas, tales como, pero no limitados a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor y suministro de moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína soluble hialuronidasa u otro agente tal como sistemas de suministro de retrovirus.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los liposomas y/o nanopartículas también pueden emplearse con la

administración de las composiciones de la presente invención. Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de dos capas concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. La sonicación de las MLV da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 angstroms que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras distintas a los liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la razón molar de lípido a agua. A bajas razones, se forman los liposomas. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas experimentan una transición de fase que altera marcadamente su permeabilidad. La transición de fase implica un cambio de una estructura ordenada estrechamente empaquetada, conocida como estado de gel, a una estructura menos empaquetada, menos apretada, conocida como estado fluido. Esto ocurre a una temperatura de transición de fase característica y da como resultado un aumento en la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

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

2. Cantidades de formulación

Las composiciones se pueden formular para administración de dosificación única o para administración de dosificación múltiple. Los agentes se pueden formular para administración directa.

En las composiciones o combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente memoria en donde el agente antihialuronano es una enzima de degradación de hialuronano tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se formula en una cantidad para administración directa en un intervalo entre o aproximadamente entre 0,5 µg y 50 mg, tal como 100 µg y 1 mg, 1 mg y 20 mg, 100 µg y 5 mg, 0,5 µg y 1.450 µg, 1 µg y 1.000 µg, 5 µg y 1.250 µg, 10 µg y 750 µg, 50 µg y 500 µg, 0,5 µg y 500 µg o 500 µg y 1450 µg. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se formula en una cantidad para administración directa en un intervalo entre o aproximadamente entre 15 Unidades (U) o 150 Unidades (U) y 60.000 Unidades por dosis, 300 U y 30.000 U, 500 U y 25.000 U, 500 U y 10.000 U, 150 U y 15.000 U, 150 U y 5.000 U, 500 U y 1.000 U, 5.000 U y 45.000 U, 10.000 U y 50.000 U o 20.000 U y 60.000 U, por ejemplo al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 15 U, 50 U, 100 U, 200 U, 300 U; 400 U; 500 U; 600 U; 700 U; 800 U; 900 U; 1.000 U; 1.250 U; 1.500 U; 2.000 U; 3.000 U; 4.000 U; 5.000 U; 6.000 U; 7.000 U; 8.000 U; 9.000 U; 10.000 U; 20.000 U; 30.000 U; 40.000 U; o 50.000 U. La enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se puede proporcionar en forma de una solución de partida de o aproximadamente de 50 U/mL a 15.000 U/ml, tal como 10 U/mL a 500 U/ml, 1.000 U/mL a 15.000 U/mL, 100 U/mL a 5.000 U/mL, 500 U/mL a 5.000 U/mL o 100 U/mL a 400 U/mL, por ejemplo al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 50 U/mL, 100 U/mL, 150 U/mL, 200 U/mL, 400 U/mL, 500 U/mL, 1.000 U/mL, 2.000 Unidades/mL, 3.000 U/mL, 4.000 U/mL, 5.000 U/mL, 6.000 U/mL, 7.000 U/mL, 8.000 U/mL, 9.000 U/mL, 10.000 U/mL, 11.000 U/mL, 12.000 U/mL, o 12.800 U/mL. El volumen de la composición puede ser de 0,5 mL a 1.000 mL, tal como de 0,5 mL a 100 mL, de 0,5 mL a 10 mL, de 1 mL a 500 mL, de 1 mL a 10 mL, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL o más. La composición generalmente se formula de modo que la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero no se administre a volúmenes superiores a aproximadamente 50 mL, y típicamente se administre a un volumen de 5-30 mL, generalmente en un volumen que no sea superior a aproximadamente 10 mL. Para volúmenes más grandes, el tiempo de infusión se puede adaptar para facilitar el suministro del mayor volumen. Por ejemplo, el tiempo de infusión puede ser de al menos 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora o más.

En las composiciones o combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente memoria, el taxano dirigido a un tumor, tal como un taxano unido a albúmina, por ejemplo, paclitaxel unido a albúmina, se formula en una cantidad para administración directa del taxano en un intervalo entre o aproximadamente entre 10 mg a 1000 mg, tal como 20 mg y 500 mg, 10 mg y 250 mg, 75 mg y 400 mg, 100 mg y 200 mg, 150 mg y 400 mg, 200 mg y 800 mg, 50

mg y 200 mg o 50 mg y 150 mg. La composición se puede proporcionar como una forma liofilizada para una posterior reconstitución o como una formulación líquida. Por ejemplo, la reconstitución de una formulación líquida puede ser con agua o cloruro sódico al 0,9% u otra solución fisiológica. Cuando se reconstituye o proporciona como una formulación líquida, se puede proporcionar la composición que contiene taxano en la formulación de taxano dirigido a un tumor como una solución de partida de entre o aproximadamente entre 0,01 mg/mL y 100 mg/ml, tal como 1 mg/mL y 50 mg/ml, 2,5 mg/mL y 25 mg/ml, de 5 mg/mL y 15 mg/mL o de 10 mg/mL y 100 mg/ml, por ejemplo al menos o aproximadamente al menos 5 mg/ml. El volumen de la composición puede ser de 0,5 mL a 1.000 mL, tal como de 0,5 mL a 100 mL, de 0,5 mL a 10 mL, de 1 mL a 500 mL, de 1 mL a 10 mL, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL o más. El contenido del vial completo se puede retirar para su administración, o se puede dividir en una pluralidad de dosificaciones para una administración múltiple. Para volúmenes más grandes, el tiempo de infusión se puede adaptar para facilitar el suministro del mayor volumen. Por ejemplo, el tiempo de infusión puede ser de al menos 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora o más. Se entiende que las formulaciones de un taxano pueden contener otros componentes, que incluyen portadores, polímeros, lípidos y otros excipientes. Las dosificaciones proporcionadas anteriormente son con respecto al componente taxano, que es el ingrediente activo.

Por ejemplo, Abraxane®, un paclitaxel unido a albúmina, se formula como una formulación libre de solvente de paclitaxel en la que el paclitaxel se compleja solo con albúmina para formar partículas estables o de aproximadamente 130 nm de tamaño. Cada vial de 50 mL de Abraxane® contiene 100 mg de paclitaxel y aproximadamente 900 mg de albúmina humana en forma de una torta estéril liofilizada. Cada vial se proporciona para ser reconstituido con 20 mL de Inyección de Cloruro de Sodio al 0,9% USP para producir una suspensión que contiene 5 mg/mL de paclitaxel. La suspensión reconstituida de Abraxane se infunde a una dosis recomendada de 260 mg/m² por vía intravenosa durante 30 minutos.

En las composiciones o combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente memoria, el análogo de nucleósido, tal como gemcitabina o un derivado del mismo, se formula en una cantidad para administración directa en un intervalo entre o aproximadamente entre 100 mg y 5.000 mg, tal como 500 mg y 5.000 mg, 500 mg y 2.500 mg, 1.000 mg y 2.500 mg, 2.000 mg y 5.000 mg o 1.500 mg y 2.500 mg, generalmente al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg o 1.000 mg. La composición se puede proporcionar como una forma liofilizada para una posterior reconstitución o como una formulación líquida. Por ejemplo, la reconstitución de una formulación líquida puede ser con agua o cloruro sódico al 0,9% u otra solución fisiológica. Cuando se reconstituye o se proporciona como una formulación líquida, la composición se puede proporcionar como una solución de partida que contiene un análogo de nucleósido de entre o aproximadamente entre 1 mg/mL y 500 mg/ml, tal como 5 mg/mL y 100 mg/ml, 10 mg/mL y 50 mg/ml, 25 mg/mL y 200 mg/mL o 20 mg/mL y 100 mg/ml, por ejemplo al menos o aproximadamente al menos 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/mL, 30 mg/mL o 40 mg/mL, y generalmente no más de 40 mg/mL para minimizar la disolución incompleta. El volumen de la composición puede ser de 0,5 mL a 1.000 mL, tal como de 0,5 mL a 100 mL, de 0,5 mL a 10 mL, de 1 mL a 500 mL, de 1 mL a 10 mL, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 100 mL 200 mL o más. El contenido del vial completo se puede retirar para su administración, o se puede dividir en una pluralidad de dosificaciones para una administración múltiple. Para volúmenes más grandes, el tiempo de infusión se puede adaptar para facilitar el suministro del mayor volumen. Por ejemplo, el tiempo de infusión puede ser de al menos 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora o más. Tras la retirada de una cantidad de fármaco para su administración, la formulación se puede diluir adicionalmente si se desea, por ejemplo diluir en agua, solución salina (p.ej. 0,9%) u otra solución fisiológica. Se entiende que las formulaciones de un análogo de nucleósido (p.ej. gemcitabina o un derivado) pueden contener otros componentes, incluyendo portadores, polímeros, lípidos y otros excipientes. Las dosificaciones proporcionadas anteriormente son con respecto al componente análogo de nucleósido, que es el ingrediente activo.

Por ejemplo, Gemzar®, gemcitabina para inyectables, se proporciona como una formulación liofilizada que contiene 200 mg o 1.000 mg de agente activo por vial. Cada vial se proporciona para ser reconstituido con 5 mL o 25 mL, respectivamente, de Cloruro de Sodio al 0,9% para inyectables USP para producir una suspensión que contiene 40 mg/mL de gemcitabina (lo que representa el volumen de desplazamiento del polvo liofilizado, la concentración reconstituida puede ser o ser de aproximadamente 38 mg/ml). Antes de la administración, la cantidad apropiada de fármaco se puede diluir adicionalmente con cloruro sódico al 0,9% u otra solución fisiológica.

3. Envasado y artículos de fabricación

También se proporcionan artículos de fabricación que contienen materiales de envasado, cualquier composición farmacéutica o la combinación proporcionada en la presente memoria, y una etiqueta que indica que las composiciones y combinaciones se van a utilizar para el tratamiento de cánceres, tales como cánceres de tumores estromales o cánceres de tumores sólidos. Los ejemplos de artículos de fabricación son recipientes que incluyen recipientes de cámara única y de cámara doble.

Los recipientes incluyen, pero no están limitados a, tubos, frascos y jeringas. Los recipientes pueden incluir adicionalmente una aguja para administración subcutánea.

En un ejemplo, el artículo de fabricación contiene una composición farmacéutica que contiene el agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, y taxano dirigido a un tumor y ningún agente o tratamiento adicional. En otro ejemplo, el artículo de fabricación contiene composiciones farmacéuticas que contienen el agente antihialuronano, por ejemplo, enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, el taxano dirigido a un tumor y un agente quimioterapéutico adicional (p.ej. análogo de nucleósido). En este ejemplo, los agentes se pueden proporcionar juntos o por separado, para su envasado en forma de artículos de fabricación.

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

La elección del envase depende de los agentes, y de si dichas composiciones se envasarán juntas o por separado. En general, el envase no es reactivo con las composiciones contenidas en el mismo. En otros ejemplos, algunos de los componentes se pueden envasar como una mezcla. En otros ejemplos, todos los componentes se envasan por separado. Por lo tanto, por ejemplo, los componentes se pueden envasar como composiciones separadas que, al mezclarse inmediatamente antes de su administración, se pueden administrar directamente juntas. Alternativamente, los componentes pueden envasarse como composiciones separadas para administración por separado.

Los componentes se pueden envasar en un recipiente. Los componentes se envasan por separado en el mismo recipiente. Generalmente, los ejemplos de tales recipientes incluyen aquellos que tienen un espacio cerrado, definido que contiene la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, y un espacio cerrado, definido y separado que contiene el otro componente o los otros componentes de manera que las zonas posteriores están separadas por una membrana fácilmente extraíble que, después de la eliminación, permite que los componentes se mezclen, o que permite que los componentes se administren por separado. Se contempla cualquier recipiente u otro artículo de fabricación, siempre que los agentes estén separados de los otros componentes antes de la administración. Para realizaciones adecuadas, véanse, por ejemplo, los recipientes descritos en la Patentes de los Estados Unidos Núm. 3.539.794 y 5.171.081.

Las composiciones seleccionadas incluyendo artículos de fabricación de las mismas también se pueden proporcionar en forma de kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y un elemento para administración proporcionado como artículo de fabricación. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para la aplicación incluyendo dosis, regímenes de dosificación e instrucciones para los modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente memoria y un artículo para diagnóstico.

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

Los agentes en las composiciones de la presente memoria se pueden evaluar para determinar sus propiedades y actividades. Las propiedades y actividades pueden estar relacionadas con actividades biológicas y/o actividades tumogénicas. Los ensayos se pueden realizar *in vitro* o *in vivo*. Tales ensayos pueden incluir, entre otros, la medición de las cantidades de hialuronano en biopsias de tejido o de tumor o de hialuronano soluble en plasma, mediciones de catabolitos de hialuronano en sangre u orina, mediciones de actividad hialuronidasa en plasma o mediciones de presión de líquido intersticial, volumen vascular o contenido de agua en tumores. Los ensayos se pueden utilizar para evaluar los efectos de los agentes, incluyendo los efectos de la dosis y la vía de administración.

1. Ensayos *In Vitro*

a. Actividad hialuronidasa de una enzima de degradación de hialuronano

La actividad de una enzima de degradación de hialuronano puede evaluarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ensayo USP XXII para hialuronidasa determina la actividad indirectamente al medir la cantidad de sustrato, ácido hialurónico, o de hialuronano (HA) no degradada que queda después de que se haya dejado reaccionar la enzima con el HA durante 30 minutos a 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Se puede utilizar una Solución Patrón de Referencia de Hialuronidasa (USP) o Hialuronidasa Patrón del Formulario Nacional (NF) en un ensayo para determinar la actividad, en unidades, de cualquier hialuronidasa. En un ejemplo, la actividad se mide utilizando un ensayo de microturbidez. Éste se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con la

albúmina sérica. La actividad se mide incubando hialuronidasa con hialuronato sódico (ácido hialurónico) durante un período de tiempo determinado (p.ej., 10 minutos) y a continuación precipitando el hialuronato sódico no digerido con la adición de albúmina sérica acidulada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un período de desarrollo adicional. La disminución de la turbidez resultante de la actividad de la hialuronidasa en el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática de la hialuronidasa. En otro ejemplo, la actividad hialuronidasa se mide utilizando un ensayo de microtitulación en el que se mide el ácido hialurónico biotinilado residual después de la incubación con hialuronidasa (véase p.ej. Frost y Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, Publicación de la Patente de Estados Unidos Núm. 20050260186). Los grupos carboxilo libres en los residuos de ácido glucurónico del ácido hialurónico se biotinilan, y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado se acopla covalentemente a una placa de microtitulación. Después de la incubación con hialuronidasa, se detecta el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual utilizando una reacción de avidina-peroxidasa, y se compara con la reacción siguiente obtenida con patrones de hialuronidasa de actividad conocida. También se conocen en la técnica otros ensayos para medir la actividad hialuronidasa y se pueden utilizar en los métodos de la presente memoria (véase p.ej. Delpech et al., (1995) Anal. Biochem. 229:35-41; Takahashi et al., (2003) Anal. Biochem. 322:257-263).

También se puede evaluar la capacidad de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble modificada (p.ej., rHuPH20 PEGilada) para actuar como un agente de diseminación o difusión. Por ejemplo, se puede inyectar colorante azul tripán, tal como subcutáneamente o intradérmicamente, con o sin una enzima de degradación de hialuronano en la piel lateral de cada flanco de ratones carentes de sistema inmunitario. A continuación se mide el área teñida, por ejemplo, con un microcalibrador, para determinar la capacidad de la enzima de degradación de hialuronano para actuar como un agente dispersante (véase p.ej. la Patente Publicada de los Estados Unidos Núm. 20060104968). El efecto de la co-administración de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, con otro agente, tal como un agente quimioterapéutico, sobre las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de ese agente también se puede evaluar *in vivo* utilizando modelos animales y/o sujetos humanos, tal como en el contexto de un ensayo clínico, como se comentó anteriormente y se demuestra en el Ejemplo 1, a continuación. La actividad funcional de una enzima de degradación de hialuronano que no es una hialuronidasa se puede comparar con una hialuronidasa utilizando cualquiera de estos ensayos. Esto se puede realizar para determinar la cantidad funcionalmente equivalente de una enzima de degradación de hialuronano. Por ejemplo, la capacidad de una enzima de degradación de hialuronano para actuar como un agente de diseminación o difusión se puede evaluar inyectándola (p.ej. por vía subcutánea o intradérmica) en la piel lateral de ratones con azul tripán, y se puede determinar la cantidad requerida para alcanzar la misma cantidad de difusión que, por ejemplo, 100 unidades de un Patrón de Referencia de Hialuronidasa. La cantidad de enzima de degradación de hialuronano requerida es, por lo tanto, funcionalmente equivalente a 100 unidades de hialuronidasa. También se puede medir la conductividad hidráulica (K), por ejemplo en un tumor, antes y después del tratamiento con una enzima de degradación de hialuronano modificada, tal como una hialuronidasa modificada, para evaluar la actividad de una preparación enzimática de degradación de hialuronano modificada.

Se puede evaluar la capacidad de una enzima de degradación de hialuronano modificada, tal como hialuronidasa modificada, incluyendo hialuronidasa pegilada, para afectar a uno o más de los marcadores asociados con enfermedades y trastornos asociados con hialuronano descritos anteriormente, o cualquier otro marcador o fenotipo asociado, utilizando cualquiera de los uno o más de los ensayos descritos anteriormente. Por ejemplo, se puede evaluar la capacidad de una enzima de degradación de hialuronano modificada, tal como hialuronidasa modificada, para reducir los niveles o contenido de hialuronano, la formación o el tamaño de halos, la presión de líquido intersticial, el contenido de agua y/o el volumen vascular utilizando uno o más de los ensayos anteriores *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*. En un ejemplo, se puede administrar una hialuronidasa modificada a un sujeto con un tumor o un modelo animal apropiado y evaluar el efecto sobre los niveles de hialuronano, la formación o el tamaño de los halos, la presión del líquido intersticial, el contenido de agua y/o el volumen vascular y compararlos con sujetos o modelos animales a los que no se ha administrado hialuronidasa modificada. En algunos ejemplos, la hialuronidasa modificada se puede administrar con otro agente, tal como un agente quimioterapéutico.

El experto en la técnica conoce otros ensayos para evaluar la actividad hialuronidasa, incluyendo efectos sobre la síntesis o degradación de HA, que incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos *in vitro* que miden la degradación de hialuronano (véase, p.ej. Frost y Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269), tiñendo tejido u otras muestras para HA tal como utilizando una proteína de unión a HA u otro reactivo anti-HA (véase, p.ej. Nishida et al. (1999) J. Biol. Chem., 274:21893-21899), ensayo de exclusión de partículas (Nishida et al. 1999; Morohashi et al. (2006) Biochem Biophys. Res. Comm., 345: 1454-1459); midiendo o evaluando la expresión de ARNm de HAS para un gene *has* (Nishida et al. 1999).

b. Actividad de taxano

Se encuentran disponibles procedimientos fisiológicos, farmacológicos y bioquímicos convencionales para someter a ensayo los compuestos para identificar aquellos que poseen una actividad biológica deseada para inhibir la asociación de tubulina. Se pueden utilizar ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la actividad biológica, tal como la citotoxicidad y la polimerización de tubulina (véase, p.ej. Hidaka et al. (2012) Biosci. Biotechnol. Biochem., 76:349-

352).

Por ejemplo, los compuestos de taxano proporcionados en la presente memoria se pueden someter a ensayo en un análisis de estabilización de microtúbulos (Barron et al., (2003) Anal. Biochem., 315:49-56). El ensamblaje de tubulina o su inhibición se pueden controlar en un ensayo de polimerización de tubulina en un formato de absorbancia o fluorescencia. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo de polimerización de tubulina basado en densidad óptica, ya que la concentración de un polímero de microtúbulos es proporcional a la medida de la luz dispersada por los microtúbulos. Un ejemplo de tal ensayo es el Ensayo HTS de polimerización de Tubulina (Núm. de catálogo BK004P o BK006P; Cytoskeleton, Denver, CO). También se puede utilizar un ensayo basado en fluorescencia, mediante el cual la polimerización es seguida por una potenciación de la fluorescencia debida a la incorporación de un indicador fluorescente a los microtúbulos (Núm. de catálogo BK011P, Cytoskeleton, Denver). En tales ensayos, la tubulina puede incubarse con un compuesto de taxano, tal como paclitaxel, vinblastina o docetaxel, y la polimerización se puede medir a lo largo del tiempo. Por ejemplo, en un ensayo de fluorescencia, la polimerización puede medirse controlando los cambios de la fluorescencia a una excitación a 360 nm y emisión a 420 nm. El ensamblaje de tubulina también se puede controlar mediante dispersión de la luz, que se aproxima mediante la absorción aparente a 350 nm. En el ensayo, generalmente se emplea albúmina de suero bovino (BSA) para prevenir la agregación. Además, el glicerol, que es un potenciador de la polimerización de tubulina, se omite para aumentar la razón señal/ruido. Como control, se puede utilizar el fármaco desestabilizante de microtúbulos, vinblastina, que estabiliza la tubulina y no afecta la despolimerización.

c. Actividad anticancerosa

La actividad anticancerosa de los compuestos y agentes descritos en la presente memoria, incluyendo la enzima de degradación de hialuronano, el taxano dirigido al tumor y/u otro agente quimioterapéutico (p.ej. análogo de nucleósido) y sus formulaciones puede examinar *in vitro*, por ejemplo, incubando un cultivo de células cancerosas con el derivado, y a continuación evaluando la inhibición del crecimiento celular en el cultivo. Las células adecuadas para tales pruebas incluyen células de leucemia P388 murina, de melanoma B16 y de cáncer de pulmón de Lewis, así como células de cáncer MCF7 mamarios humano, OVCAR-3 de ovario y A549 de pulmón, MX-1 (células de tumor de mama humano), HT29 (línea celular de cáncer de colon), HepG2 (líneas celulares de cáncer de hígado) y HCT116 (líneas celulares de cáncer de colon).

2. Modelos animales *in vivo*

Se pueden utilizar modelos animales para evaluar los efectos de las composiciones o combinaciones proporcionadas en la presente memoria sobre los niveles o contenido de hialuronano, la presión del líquido intersticial, el contenido de agua, el volumen vascular y el tamaño, volumen o crecimiento del tumor. Además, los modelos animales se pueden utilizar para evaluar la farmacocinética o la tolerabilidad de las composiciones o combinaciones.

Los modelos animales pueden incluir, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, cobayas y modelos de primates no humanos, tales como monos cinomolgos o macacos rhesus. Los modelos animales incluyen modelos genéticos y modelos de xenoinjerto. Por ejemplo, los modelos de xenoinjerto incluyen aquellos en los que, antes de someter a ensayo los agentes, se pueden establecer tumores en animales de ensayo adecuados, p.ej., ratones carentes de sistema inmunitario. En algunos ejemplos, a los ratones inmunodeficientes, tales como ratones carentes de sistema inmunitario o ratones SCID, se les trasplanta una línea celular tumoral, tal como un cáncer asociado a hialuronano, para establecer un modelo animal de ese cáncer. Líneas celulares ilustrativas, que incluyen cánceres asociados a hialuronano, incluyen, pero no se limitan a, células de carcinoma de próstata PC3, células de adenocarcinoma de páncreas BxPC-3, células de carcinoma de mama MDA-MB-231, células de tumor de mama MCF-7, células de tumor de mama BT474, células de tumor de próstata Tramp C2 y células de cáncer de próstata Mat-LyLu, y otras líneas celulares descritas en la presente memoria que están asociadas con hialuronano, p.ej. contienen niveles elevados de hialuronano. Un ejemplo de un modelo de tumor animal de cáncer de páncreas implica la generación de tumores en animales utilizando células de adenocarcinoma de páncreas BxPC-3 (véase p.ej. Von Hoff et al. (2011) J. Clin. Oncol., 29:4548-54).

También se pueden utilizar modelos genéticos en los que los animales se han vuelto deficientes en uno o más genes que dan como resultado la generación o formación de tumores. Tales modelos de ratón genéticamente modificados (GEMM) pueden recapitular las características moleculares y clínicas de la enfermedad. Por ejemplo, un modelo genético ilustrativo de cáncer de páncreas implica la expresión pancreática específica de mutantes endógenos de los alelos *Kras* y *Trp53*, lo que da como resultado ratones mutantes que exhiben un fenotipo deficiente (denominado ratones KPC; LSL-Kras^{G12D}, LSL-Trp53^{R172H}, Pdx-1-Cre). Los ratones KPC desarrollan tumores pancreáticos primarios que exhiben características similares a la enfermedad humana, incluyendo la resistencia al análogo de nucleósido gemcitabina (véase p.ej. Frese et al. (2012) Cancer Discovery, 2:260-269).

Las composiciones o combinaciones proporcionadas en la presente memoria se pueden administrar a los ratones

para evaluar los efectos sobre la enfermedad. Por ejemplo, se pueden evaluar o medir los niveles de hialuronano. En otro ejemplo, se pueden evaluar los efectos sobre el crecimiento tumoral o la inhibición de células tumorales. Por ejemplo, se pueden determinar los valores de DE_{50} , es decir, la cantidad de agente o agentes requeridos para lograr una inhibición de 50% del crecimiento tumoral en el animal. También se pueden determinar las tasas de supervivencia.

3. Farmacocinética y tolerabilidad

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

Las propiedades farmacocinéticas de las combinaciones o composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden evaluar midiendo parámetros tales como la concentración máxima (pico) del agente quimioterapéutico (C_{max}), el tiempo pico (es decir, cuando se produce la concentración máxima del agente quimioterapéutico; T_{max}), la concentración mínima del agente quimioterapéutico (es decir, la concentración mínima entre dosis de agente quimioterapéutico; C_{min}), la semivida de eliminación ($T_{1/2}$) y el área bajo la curva (es decir, el área bajo la curva generada al representar el tiempo frente a la concentración; AUC), después de la administración. En los casos en los que el agente quimioterapéutico se administra por vía subcutánea, la biodisponibilidad absoluta del agente se determina comparando el área bajo la curva del agente quimioterapéutico después del suministro subcutáneo (AUC_{sc}) con el AUC del agente quimioterapéutico después del suministro intravenoso (AUC_{iv}). La biodisponibilidad absoluta (F) se puede calcular con la fórmula: $F = ([AUC]_{sc} \times dosis_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times dosis_{iv})$. La concentración de agente quimioterapéutico en el plasma después de la administración subcutánea se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica adecuado para evaluar concentraciones de agente quimioterapéutico en muestras de sangre.

Se puede administrar un intervalo de dosis y una frecuencia de dosificación diferente en los estudios de farmacocinética para evaluar el efecto del aumento o disminución de las concentraciones del agente coadministrado (p.ej., análogo de nucleósido). Las propiedades farmacocinéticas de los agentes quimioterapéuticos administrados por vía subcutánea, tales como la biodisponibilidad, también se pueden evaluar con o sin co-administración de enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y/o taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, se puede administrar a perros, tales como Beagles, un tratamiento quimioterapéutico (p.ej. análogo de nucleósido tal como gemcitabina) combinado con enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y/o taxano dirigido a un tumor, o solo, utilizando una o más vías de administración. Tales estudios se pueden realizar para evaluar el efecto de la co-administración con un agente antihialuronano, como una hialuronidasa, sobre propiedades farmacocinéticas, tales como la biodisponibilidad, de agentes quimioterapéuticos.

Los estudios para evaluar la seguridad y la tolerabilidad también se conocen en la técnica y se pueden utilizar en la presente memoria. Después de la administración de la combinación y las composiciones de la presente invención, se puede controlar el desarrollo de cualquier reacción adversa. Las reacciones adversas pueden incluir, pero no se limitan a, reacciones en el sitio de inyección, tales como edema o hinchazón, dolor de cabeza, fiebre, fatiga, escalofríos, sofocos, mareos, urticaria, sibilancias u opresión en el pecho, náuseas, vómitos, temblores, dolor de espalda, dolor de pecho, calambres musculares, ataques o convulsiones, cambios en la presión sanguínea y respuestas anafilácticas o de hipersensibilidad severa. Típicamente, se debe administrar un intervalo de dosis y diferentes frecuencias de dosificación en los estudios de seguridad y tolerabilidad para evaluar el efecto de concentraciones crecientes o decrecientes de agente quimioterapéutico y/o agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, y/o taxano dirigido a un tumor en la dosis.

G. Métodos y usos de la terapia combinada

Las combinaciones y composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden utilizar en métodos de terapia para tratar cánceres, y en particular cánceres de tumores sólidos. En los métodos, se administra una terapia combinada de un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero (p.ej., una hialuronidasa, tal como una PH20, por ejemplo PEGPH20) y una formulación de taxano (p.ej., una formulación de taxano unida a albúmina) a un sujeto que tiene un tumor sólido. En algunos ejemplos, también se puede administrar otro agente análogo de nucleósido, y en particular un agente análogo de nucleósido que es un tratamiento para tumores sólidos y/o es susceptible de inhibición por desaminación (p.ej., gemcitabina o derivado de la misma). Según se encuentra en la presente memoria, la cantidad intratumoral de un análogo de nucleósido, y por lo tanto los efectos citotóxicos del mismo, en un régimen combinado con una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y una formulación de taxano excede ampliamente los efectos obtenidos cuando el análogo

de nucleósido se administra con solo uno de los agentes (es decir, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero o la formulación de taxano). Por ejemplo, los efectos pueden ser sinérgicos. La extensión y el nivel de la actividad intratumoral del análogo de nucleósido observada en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria logran resultados que hasta ahora no se han logrado con las terapias existentes, incluyen aumento de la eficacia y la supervivencia que superan los regímenes de tratamiento existentes.

1. Cánceres

La terapia combinada de un agente antihialuronano, p.ej. la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, la formulación de taxano y/o un análogo de nucleósido se puede utilizar para el tratamiento de células cancerosas, neoplasias, tumores y metástasis. La terapia combinada proporcionada en la presente memoria exhibe eficacia antitumoral y da como resultado una ralentización o reducción del crecimiento tumoral, una disminución del volumen tumoral y, en algunos casos, la eliminación o erradicación del tumor. La terapia combinada da como resultado una mayor supervivencia de los sujetos en comparación con los sujetos tratados con los mismos agentes que una terapia combinada simple o doble. Para cánceres como el cáncer de páncreas que son difíciles de tratar, la terapia combinada proporciona beneficios significativos en comparación con los métodos existentes.

Por ejemplo, la terapia combinada se puede utilizar para tratar un tumor sólido, tal como el de pulmón y bronquio, mama, colon y recto, riñón, estómago, esófago, hígado y conducto biliar intrahepático, vejiga urinaria, cerebro y otros cánceres del sistema nervioso, cabeza y cuello, cavidad oral y faringe, cuello uterino, cuerpo uterino, tiroides, ovario, testículos, próstata, melanoma maligno, colangiocarcinoma, timoma, de piel no melanoma, así como tumores hematológicos y/o tumores malignos, tales como la leucemia infantil y linfomas, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfomas de origen linfocítico y cutáneo, leucemia aguda y crónica, tal como leucemia linfoblástica aguda, mielocítica aguda o mielocítica crónica, neoplasia de células plasmáticas, neoplasia linfoide y cánceres asociados con el SIDA. Típicamente, la terapia combinada se utiliza para el tratamiento de tumores sólidos, por ejemplo, cánceres estromales de tumores sólidos. Los ejemplos de tumores incluyen, por ejemplo, tumores pancreáticos, tumores ováricos, tumores pulmonares, tumores de colon, tumores de próstata, tumores cervicales y tumores de mama.

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

En ejemplos de tratamiento de cánceres ricos en hialuronano, el agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano, puede actuar como un agente terapéutico por sí mismo y/o puede potenciar la actividad de otras terapias combinadas o coadministradas. Por ejemplo, las enzimas que degradan el hialuronano, tales como la hialuronidasa, tienen efectos anticarcinogénicos directos cuando se inyectan en los tumores. La hialuronidasa previene el crecimiento de tumores trasplantados a ratones (De Maeyer et al., (1992) *Int. J. Cancer* 51:657-660) e inhibe la formación de tumores tras la exposición a carcinógenos (Pawlowski et al. (1979) *Int. J. Cancer* 23:105-109. La hialuronidasa es efectiva como único agente terapéutico en el tratamiento del cáncer de cerebro (gliomas) (véase, la Publicación de Patente Internacional Núm. WO198802261).

Los agentes antihialuronano, tales como las enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo las hialuronidasas, también se pueden utilizar para aumentar el suministro de agentes quimioterapéuticos a los tumores. La enzima de degradación de hialuronano se puede administrar combinada con, por ejemplo, simultáneamente o antes de, uno o más agentes quimioterapéuticos u otros agentes o tratamientos anticancerosos (p.ej., tratamiento con una formulación de taxano y/o tratamiento con un análogo de nucleósido). En algunos casos, las enzimas pueden aumentar la sensibilidad de los tumores que son resistentes a la quimioterapia convencional. Por ejemplo, las enzimas de degradación de hialuronano, incluyendo hialuronidasas, como rHuPH20, se pueden administrar a un paciente en una cantidad eficaz para aumentar la difusión alrededor del sitio del tumor (p.ej., para facilitar la circulación y/o concentraciones de agentes quimioterapéuticos en y alrededor del sitio del tumor), inhibir la motilidad de las células tumorales, tal como mediante la degradación del ácido hialurónico, y/o disminuir el umbral de apoptosis de las células tumorales. Esto puede llevar a las tumorales a un estado de anoikis, lo que hace que la

célula tumoral sea más susceptible a la acción de agentes quimioterapéuticos. La administración de una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, puede inducir la capacidad de respuesta de tumores del páncreas, estómago, colon, ovarios y mama previamente resistentes a la quimioterapia (Baumgartner et al. (1988) Reg. Cancer Treat. 1:55-58; Zanker et al. (1986) Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27:390). La enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, típicamente mejora la penetración de agentes quimioterapéuticos u otros agentes anticancerosos en tumores sólidos, tratando así la enfermedad.

Selección de sujetos para el tratamiento

Los métodos incluyen etapas para seleccionar sujetos para el tratamiento que tienen un tumor o cáncer asociados a hialuronano. Tales métodos incluyen métodos para detectar marcadores de enfermedad asociados a hialuronano, que incluyen cualquier indicación de que un sujeto tiene una enfermedad asociada a hialuronano, que es probable que el sujeto responda al tratamiento por un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano, y/o que una muestra del sujeto, tal como un tejido, célula o fluido, contiene una expresión de hialuronano elevada. Los ensayos ilustrativos para detectar marcadores se describen a continuación e incluyen ensayos para medir el nivel de HA y/o niveles de HA relativos en una muestra de un sujeto, ensayos para analizar los efectos de enzimas de degradación de hialuronano en una muestra del sujeto y ensayos para medir lecturas típicamente asociada con ciertas enfermedades/afecciones asociadas con hialuronano, tales como baja expresión o actividad de hialuronidasa, alta presión de líquido intersticial, volumen vascular y contenido de agua. En general, se puede utilizar cualquier ensayo conocido para la detección de proteínas o ácidos nucleicos en muestras de sujetos, o para evaluar los efectos del tratamiento en células/tejidos *in vitro*.

Los sujetos seleccionados para el tratamiento en los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen sujetos que tienen niveles elevados, aberrantes o acumulados de hialuronano en comparación con sujetos que no tienen la enfermedad o afección o en comparación con tejidos o muestras normales que no tienen expresión elevada, aberrante o acumulada de HA. Se puede someter a ensayo cualquier muestra o tejido de un sujeto y comparar con una muestra o tejido normal. Los niveles de hialuronano se pueden medir a partir de cualquier fuente tal como a partir de un tejido (p.ej., mediante biopsia), tumor, células, o a partir de sangre, suero, orina u otros fluidos corporales. Por ejemplo, como se describe en otra parte en la presente memoria, los perfiles de depósito de HA en tumores sólidos se han categorizado generalmente como pericelulares o estromales. Se han observado niveles elevados de HA en plasma, sobre todo en pacientes con tumor de Wilms, mesotelioma y metástasis hepáticas. Por lo tanto, dependiendo de la enfermedad o afección, se puede medir una muestra diferente para determinar los niveles de hialuronano. La elección de la muestra está dentro del nivel de un experto en la técnica.

El ensayo utilizado para medir los niveles de sustrato de hialuronidasa está en función de la enfermedad o afección y se puede seleccionar basándose en la enfermedad o afección concretas. Un experto en la técnica está familiarizado con los métodos de detección de hialuronano, que incluyen, pero no se limitan a, métodos de inmunohistoquímica o métodos de ELISA.

En un ejemplo, la etapa para detectar marcadores se realiza antes de tratar a un sujeto, por ejemplo, para determinar si el sujeto tiene una afección o enfermedad asociada con hialuronano que será susceptible de tratamiento con una enzima de degradación de hialuronano. En este ejemplo, si el marcador es detectado (p.ej. si se determina que una célula, tejido o fluido del paciente contiene una expresión elevada de hialuronano o responde a la enzima de degradación de hialuronano), se realiza una etapa de tratamiento, donde se administra al sujeto una enzima de degradación de hialuronano. En un ejemplo, cuando el marcador no se detecta (p.ej. si se determina que una célula, tejido o fluido del paciente contiene expresión de hialuronano normal o no elevada o no responde a la enzima de degradación de hialuronano), se puede seleccionar otra opción de tratamiento.

En otro ejemplo, la etapa para detectar marcadores se realiza después de tratar a un sujeto, o durante el curso del tratamiento del sujeto, (p.ej. tratamiento con el agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano (p.ej. hialuronidasa modificada soluble) (con o sin un agente coadministrado)), por ejemplo, para determinar si el tratamiento con el agente antihialuronano está teniendo un efecto en el tratamiento de la enfermedad o afección. En uno de esos ejemplos, el marcador no se detecta o se detecta en una cantidad o nivel relativo que disminuye en comparación con la cantidad/nivel antes del tratamiento, o en comparación con otra muestra, el tratamiento continúa, se realiza otra ronda de tratamiento, o se inicia otro tratamiento, tal como una terapia combinada. En otro ejemplo similar, si el marcador se detecta al mismo nivel que antes del tratamiento u otra muestra, se puede seleccionar otra opción de tratamiento.

Los ensayos para detectar marcadores de enfermedades y afecciones asociadas a hialuronano incluyen ensayos para medir la cantidad (p.ej. cantidad relativa) de expresión de hialuronano y/o hialuronidasa en un tejido, célula y/o fluido corporal de un sujeto, por ejemplo, un tumor. Entre estos ensayos están incluidos aquellos que pueden detectar la expresión de HA, la expresión de Hialuronano sintasa 1 (HAS1), expresión de Hialuronano sintasa 2 (HAS2), expresión de Hialuronano sintasa 3 (HAS3), la presencia de HALO (regiones de matriz pericelular que son ricas en proteoglicanos, incluyendo hialuronano) y la presencia de enzimas de degradación de hialuronano, tales

como hialuronidasas, por ejemplo, en muestras del sujeto.

Los ensayos para detectar niveles de proteína y ácido nucleico son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar en los métodos de la presente memoria para medir la expresión de hialuronano, hialuronano sintasa u otra proteína y/o ácido nucleico. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, ELISA, SDS-PAGE, transferencia Western, PCR, RT-PCR, inmunohistoquímica, histología y citometría de flujo. Por ejemplo, una muestra de un sujeto, tal como una muestra de tejido (p.ej. una biopsia de un tumor de un paciente o modelo animal, una muestra estromal), un fluido (p.ej. sangre, orina, plasma, saliva u otra muestra), una célula o muestra celular, o extracto, u otra muestra, se pueden teñir con anticuerpos anti-HA o proteínas de unión a HA, por ejemplo, utilizando tinción histológica, tal como inmunohistoquímica (IHC) de secciones de tejido fijas o congeladas, para determinar la presencia y extensión de hialuronano en el tejido o muestra, o tinción celular inmunofluorescente, ensayos de interacción y precipitación y citometría de flujo. En otro ejemplo, la muestra, p.ej. biopsia, se puede analizar mediante RT-PCR para evaluar la cantidad de ARNm de HA.

Los métodos conocidos para la detección de la expresión de hialuronano en el cáncer incluyen, pero no se limitan a, el ensayo de tipo ELISA descrito por Lokeshwar et al., (1997) en Cancer Res. 57:773-777, para medir los niveles de HA en orina o extractos de tejido de vejiga de sujetos que tienen cáncer de vejiga. Para el ensayo, la orina o los extractos se aplican como recubrimiento sobre placas de micropocillos (también se aplica como recubrimiento el HA de cordón umbilical utilizado como patrón), seguido de incubación (p.ej. 16 horas, temperatura ambiente) con una proteína de unión a HA marcada (p.ej. biotinilada), tal como las descritas en la presente memoria, se lava y se cuantifica la proteína de unión a HA unida a los pocillos utilizando un sustrato de agente de detección de avidina-biotina. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, la orina de un sujeto con un cáncer de vejiga asociado a HA contenía niveles de HA que se elevaron 2-9 veces en comparación con la orina/extractos de pacientes normales (sujetos sanos o sujetos con otras enfermedades o afecciones gastrourinarias); por lo tanto, el marcador se detectaría si los niveles de HA en la orina fueran elevados en comparación con los sujetos normales, p.ej. una elevación entre o aproximadamente 2 veces y 9 veces o aproximadamente 9 veces, p.ej. una elevación de o aproximadamente de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 veces en comparación con el sujeto normal.

En un ejemplo adicional, la expresión y producción de hialuronano en células tumorales *in vitro* se puede evaluar utilizando cualquiera de los métodos descritos anteriormente. De forma similar, la producción de hialuronano sintasa (p.ej., HAS1, HAS2 o HAS3) y/o la expresión por células *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* también se pueden someter a ensayo, por ejemplo, mediante ELISA, SDS-PAGE, transferencia Western, PCR, RT-PCR, inmunohistoquímica, histología o citometría de flujo.

En otro ejemplo, se determina la cantidad de actividad hialuronidasa en una muestra del sujeto, por ejemplo en sangre o plasma por ejemplo con un ensayo de turbidez.

En otro ejemplo, se aísla una célula u otro tejido de un paciente, p.ej. una célula tumoral, y se utiliza en un estudio para determinar si la célula o el tejido responden al tratamiento con la enzima de degradación de hialuronano *in vitro*, por ejemplo, utilizando un ensayo clonogénico o cualquier otro ensayo para medir el crecimiento, la proliferación y/o la supervivencia de células o tejidos, tales como células tumorales, en respuesta al tratamiento. Por ejemplo, las células cancerosas de un sujeto pueden sembrarse en la superficie, tal como una matriz extracelular o una mezcla de proteínas, tal como la mezcla comercializada con el nombre comercial Matrigel® (BD Biosciences). En este ejemplo, el marcador asociado a hialuronano es la sensibilidad de la célula o tejido a la administración de la enzima de degradación de hialuronano. En este ejemplo, si se inhibe o bloquea cualquier propiedad, tal como proliferación, crecimiento o supervivencia de las células mediante la adición de enzima de degradación de hialuronano, se determina que el sujeto puede ser susceptible de tratamiento con composiciones que contienen enzimas de degradación de hialuronano.

Además de los ensayos para determinar los niveles de expresión del hialuronano, se pueden utilizar otros ensayos para seleccionar un sujeto para el tratamiento y/o para evaluar la eficacia y/o la duración del tratamiento. La presión del líquido intersticial (PLI) se puede medir utilizando una sonda o aparato apropiado. Por ejemplo, se puede utilizar un catéter con punta transductora para medir la PLI en tejidos cancerosos u otros tejidos de interés. El catéter pasa a través del orificio interno de una aguja quirúrgica, que a continuación se inserta en el centro del tumor. La aguja se retira mientras el catéter se mantiene en posición. La PLI (mmHg) se puede medir a continuación utilizando una unidad de adquisición de datos apropiada (Ozderem et al. (2005) Microvasc. Res. 70:116-120). Otros métodos para medir la PLI incluyen el método de mecha en aguja "wick-in-needle" (Fadnes et al. (1977) Microvasc. Res. 14:27-36).

El volumen vascular se puede medir, por ejemplo, utilizando imágenes de ultrasonido. Este método emplea microburbujas hiper-ecoicas para proporcionar las fuertes reflexiones de ondas de ultrasonido que se detectan. Las microburbujas, cuando se inyectan, por ejemplo intravenosamente, a un sujeto o modelo animal, se mueven a través del espacio vascular debido a su tamaño. Los ensayos para evaluar el contenido de agua en el tejido, tal como el contenido de agua del tejido tumoral, también son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las muestras de un tumor se pueden cosechar, transferir, pesar y congelar rápidamente antes de ser liofilizadas. El peso de agua es referido a

continuación como la razón de peso de tejido húmedo con respecto a peso seco (es decir, liofilizado).

La capacidad de una célula tumoral para formar matrices pericelulares (halos) *in vitro* se puede evaluar utilizando un ensayo de exclusión de partículas. Se pueden añadir pequeñas partículas (glóbulos rojos fijados con formalina) a cultivos de células tumorales de baja densidad en presencia, por ejemplo, de agregano, que es un gran proteoglicano de condroitín sulfato de agregación. Después de que las partículas se sedimentan, los cultivos se pueden observar a 400 aumentos para determinar si las células tumorales formaron halos. Esto se puede visualizar como zonas alrededor de las células de las cuales se excluyen las partículas.

Para cualquiera de los métodos de detección, el marcador (p.ej. expresión de HA, sensibilidad a la enzima de degradación de hialuronano, expresión de HA-sintasa o actividad hialuronidasa) típicamente se compara con una muestra de control, de manera que la detección del marcador incluye típicamente la determinación de que la lectura es elevada o reducida en comparación con la muestra de control.

Por ejemplo, la muestra de control puede ser otro tejido, célula o fluido corporal, tal como un tejido normal, célula o fluido corporal, por ejemplo, un tejido, célula o fluido corporal que es análogo a la muestra que se somete a ensayo, pero aislada de un sujeto diferente, tal como un sujeto que es normal (es decir, no tiene una enfermedad o afección, o no tiene el tipo de enfermedad o afección que tiene el sujeto que se está sometiendo a ensayo), por ejemplo, un sujeto que no tiene un enfermedad o afección asociada hialuronano, o un tejido análogo de otro sujeto que tiene una enfermedad o afección similar, pero cuya enfermedad no es tan grave y/o no está asociada con hialuronano o expresa relativamente menos hialuronano y, por lo tanto, está asociada a hialuronano en menor grado. Por ejemplo, cuando la célula, tejido o fluido que se están evaluando son un sujeto que tiene cáncer, se pueden comparar con un tejido, célula o fluido de un sujeto que tiene un cáncer menos grave, tal como un cáncer en fase temprana, diferenciado u otro tipo de cáncer. En otro ejemplo, la muestra de control es un fluido, tejido, extracto (p.ej. extracto celular o nuclear), ácido nucleico o preparación de péptidos, línea celular, biopsia, patrón u otra muestra, con una cantidad conocida o cantidad relativa de HA, tal como una muestra, por ejemplo una línea celular tumoral, que se sabe que expresa niveles relativamente bajos de HA, tales como líneas celulares tumorales ilustrativas descritas en la presente memoria que expresan bajos niveles de HA, por ejemplo, la línea celular HCT 116, la línea celular HT29, la línea celular NCI H460, la línea celular DU145, la línea celular Capan-1, y tumores de modelos tumorales generados utilizando tales líneas celulares.

Se entiende que el cambio particular, p.ej. aumentar o disminuir HA, depende del ensayo utilizado. Por ejemplo, en un ELISA, la multiplicidad de aumento o disminución de la absorbancia a una longitud de onda concreta o de la cantidad de proteína (p.ej. según se determina al utilizar una curva patrón) se puede expresarse con respecto a un control. En un ensayo de PCR, como la RT-PCR, se puede comparar con los niveles de expresión de control (p.ej. expresados como multiplicidad de cambio) utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como el uso de patrones.

Por ejemplo, cuando se somete a ensayo la cantidad de hialuronano en una muestra de un sujeto, la detección del marcador puede determinar que la cantidad de HA en la muestra (p.ej. célula, tejido o fluido cancerosos) del sujeto es elevada en comparación con una muestra de control, tal como una muestra de control descrita en el párrafo anterior. En un ejemplo, se determina que el cáncer es un cáncer rico en hialuronano si la cantidad de HA en el tejido, la célula o el líquido está elevada en aproximadamente 0,5 veces, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 20 veces, o más, en comparación con la muestra de control, que puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, un fluido, tejido, extracto (p.ej. extracto celular o nuclear), ácido nucleico o preparación de péptidos, línea celular, biopsia, patrón u otra muestra, con una cantidad conocida o cantidad relativa de HA, tal como una muestra, por ejemplo una línea celular tumoral, que se sabe que expresa niveles relativamente bajos de HA, tales como líneas celulares tumorales ilustrativas descritas en la presente memoria que expresan bajos niveles de HA, por ejemplo, la línea celular HCT 116, la línea celular HT29, la línea celular NCI H460, la línea celular DU145, la línea celular Capan-1, y tumores de modelos tumorales generados utilizando tales líneas celulares.

Además, en tales métodos, el nivel de hialuronano asociado a células puede calificarse como bajo, moderado o alto. Por ejemplo, la expresión de HA se considera alta o moderada si 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o más del área tumoral muestra señal de HA persistente. Típicamente, el tratamiento de sujetos con HA al menos de moderado a alto se contempla en la presente memoria.

2. Dosificación y administración

La terapia combinada proporcionada en la presente memoria que contiene un agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano y un taxano dirigido a un tumor, y opcionalmente un análogo de nucleósido combinado adicionalmente, se administra en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil. Típicamente, los agentes activos se administran en una cantidad que no da como resultado efectos secundarios indeseables del paciente que se está tratando, o que minimiza o reduce los efectos secundarios observados en

comparación con las dosificaciones y cantidades requeridas para un único tratamiento con uno de los agentes anteriores. Por ejemplo, como se describe en otra parte de la presente memoria, se encuentra en la presente memoria que la terapia combinada con una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y un taxano dirigido a un tumor da como resultado un aumento del suministro intratumoral y un aumento de la semivida intratumoral de un análogo de nucleósido coadministrado, p.ej. una gemcitabina. Por lo tanto, la cantidad de un análogo de nucleósido (p.ej. gemcitabina) que se puede administrar en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria, en comparación con las cantidades de un análogo de nucleósido administrado utilizando métodos de la técnica anterior (p.ej. gemcitabina en monoterapia o doble terapia junto con otro agente) se reduce, mientras se logra sustancialmente una eficacia terapéutica igual o mejorada. En virtud de la disminución de la dosis que se administra, los efectos secundarios asociados con la administración del análogo de nucleósido (p.ej. gemcitabina), tal como inmunosupresión o mielosupresión, se reducen, minimizan o evitan.

Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar las cantidades precisas de agentes activos, incluyendo el agente antihialuronano, por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, taxano dirigido a un tumor y, opcionalmente, un análogo de nucleósido, que se va a administrar a un sujeto. Por ejemplo, tales agentes y usos para el tratamiento de enfermedades y afecciones, tales como cánceres y tumores sólidos, son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, las dosis de tales agentes en una composición o terapia combinada se pueden seleccionar basándose en regímenes de dosificación convencionales para ese agente bajo una ruta de administración dada.

Se entiende que la dosificación y la duración del tratamiento precisas son una función del tejido o tumor que se están tratando y se pueden determinar empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación a partir de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro* y/o se pueden determinar a partir de los regímenes de dosificación conocidos del agente concreto. Cabe señalar que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado, el peso del individuo, la vía de administración y/o la extensión o gravedad de la enfermedad y otros factores a considerar que están dentro del nivel de un facultativo cualificado. En general, los regímenes de dosificación se eligen para limitar la toxicidad. Cabe señalar que el médico a cargo sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia a una dosis menor debido a la toxicidad, o disfunciones de la médula ósea, el hígado o el riñón u otros tejidos. Por el contrario, el médico a cargo también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera la adecuada (lo que excluye los efectos secundarios tóxicos). Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente memoria son meramente ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la misma.

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

Así, por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20, conjugada con un polímero, por ejemplo, un PEG, se puede administrar a una cantidad de o de aproximadamente 10 a 50.000.000 de Unidades, 10 a 40.000.000 de Unidades, 10 a 36.000.000 de Unidades, 10 a 12.000.000 de Unidades, 10 a 1.200.000 Unidades, 10 a 1.000.000 de Unidades, 10 a 500.000 Unidades, 100 a 100.000 Unidades, 500 a 50.000 Unidades, 1000 a 10.000 Unidades, 5.000 a 7.500 Unidades, 5.000 Unidades a 50.000 Unidades, o 1.000 a 10.000 Unidades. Generalmente, se administra a un sujeto una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero en una cantidad que está entre o aproximadamente entre 0,01 µg/kg y 25 mg/kg, tal como 0,0005 mg/kg (0,5 µg/kg) a 25 mg/kg, 0,5 µg/kg a 10 mg/kg, 0,02 mg/kg a 1,5 mg/kg, 0,01 µg/kg a 15 µg/kg, 0,05 µg/kg a 10 µg/kg, 0,75 µg/kg a 7,5 µg/kg o 1,0 µg/kg a 3,0 µg/kg. La enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se puede administrar, por ejemplo, a una dosificación de al menos o aproximadamente al menos 0,0005 mg/kg (del sujeto), 0,0006 mg/kg, 0,0007 mg/kg, 0,0008 mg/kg, 0,0009 mg/kg, 0,001 mg/kg, 0,0016 mg/kg, 0,002 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,004 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,006 mg/kg, 0,007 mg/kg, 0,008 mg/kg, 0,009 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,016 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,5

mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23 mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg o más a un sujeto humano adulto promedio, que típicamente pesa aproximadamente de 70 kg a 75 kg.

Una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como una hialuronidasa PEGilada (p.ej., PEGPH20), proporcionada en la presente memoria se puede administrar entre o aproximadamente entre 1 Unidad/kg y 800.000 Unidades/kg, tal como de 10 a 800.000 Unidades/kg, de 10 a 750.000 Unidades/kg, de 10 a 700.000 Unidades/kg, de 10 a 650.000 Unidades/kg, de 10 a 600.000 Unidades/kg, de 10 a 550.000 Unidades/kg, de 10 a 500.000 Unidades/kg, de 10 a 450.000 Unidades/kg, de 10 a 400.000 Unidades/kg, de 10 a 350.000 Unidades/kg, de 10 a 320.000 Unidades/kg, de 10 a 300.000 Unidades/kg, de 10 a 280.000 Unidades/kg, de 10 a 260.000 Unidades/kg, de 10 a 240.000 Unidades/kg, de 10 a 220.000 Unidades/kg, de 10 a 200.000 Unidades/kg, de 10 a 180.000 Unidades/kg, de 10 a 160.000 Unidades/kg, de 10 a 140.000 Unidades/kg, de 10 a 120.000 Unidades/kg, de 10 a 100.000 Unidades/kg, de 10 a 80.000 Unidades/kg, de 10 a 70.000 Unidades/kg, de 10 a 60.000 Unidades/kg, de 10 a 50.000 Unidades/kg, de 10 a 40.000 Unidades/kg, de 10 a 30.000 Unidades/kg, de 10 a 20.000 Unidades/kg, de 10 a 15.000 Unidades/kg, de 10 a 12.800 Unidades/kg, de 10 a 10.000 Unidades/kg, de 10 a 9.000 Unidades/kg, de 10 a 8.000 Unidades/kg, de 10 a 7.000 Unidades/kg, de 10 a 6.000 Unidades/kg, de 10 a 5.000 Unidades/kg, de 10 a 4.000 Unidades/kg, de 10 a 3.000 Unidades/kg, de 10 a 2.000 Unidades/kg, de 10 a 1.000 Unidades/kg, de 10 a 900 Unidades/kg, de 10 a 800 Unidades/kg, de 10 a 700 Unidades/kg, de 10 a 500 Unidades/kg, de 10 a 400 Unidades/kg, de 10 a 300 Unidades/kg, de 10 a 200 Unidades/kg, de 10 a 100 Unidades/kg, de 16 a 600.000 Unidades/kg, de 16 a 500.000 Unidades/kg, de 16 a 400.000 Unidades/kg, de 16 a 350.000 Unidades/kg, de 16 a 320.000 Unidades/kg, de 16 a 160.000 Unidades/kg, de 16 a 80.000 Unidades/kg, de 16 a 40.000 Unidades/kg, de 16 a 20.000 Unidades/kg, de 16 a 16.000 Unidades/kg, de 16 a 12.800 Unidades/kg, de 16 a 10.000 Unidades/kg, de 16 a 5.000 Unidades/kg, de 16 a 4.000 Unidades/kg, de 16 a 3.000 Unidades/kg, de 16 a 2.000 Unidades/kg, de 16 a 1.000 Unidades/kg, de 16 a 900 Unidades/kg, de 16 a 800 Unidades/kg, de 16 a 700 Unidades/kg, de 16 a 500 Unidades/kg, de 16 a 400 Unidades/kg, de 160 a 12.800 Unidades/kg, de 160 a 8.000 Unidades/kg, de 160 a 6.000 Unidades/kg, de 160 a 4.000 Unidades/kg, de 160 a 2.000 Unidades/kg, de 160 a 1.000 Unidades/kg, de 160 a 500 Unidades/kg, de 500 a 5.000 Unidades/kg, de 1000 a 100.000 Unidades/kg o de 1.000 a 10.000 Unidades/kg, de la masa del sujeto al que se administra. En algunos ejemplos, una enzima de degradación de hialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, tal como una hialuronidasa PEGilada (p.ej. PEGPH20) se puede administrar en una cantidad de o de aproximadamente 1 Unidad/kg a 1.000 Unidades/kg, 1 Unidad/kg a 500 Unidades/kg o 10 Unidades/kg a 50 Unidades/kg.

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

En los ejemplos de la presente memoria, el taxano dirigido a un tumor, tal como un taxano unido a albúmina (p.ej. paclitaxel unido a albúmina), se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para lograr el suministro intratumoral. En algunos ejemplos, un taxano dirigido a un tumor, tal como un taxano unido a albúmina (p.ej. paclitaxel unido a albúmina) se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir los niveles de proteína desaminasa intratumoral (p.ej. citidina desaminasa) en comparación con la ausencia de tratamiento, por ejemplo para reducir o disminuir los niveles en al menos o aproximadamente al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más. En ejemplos concretos, un taxano dirigido a un tumor, tal como un taxano unido a albúmina (p.ej. paclitaxel unido a albúmina) se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para aumentar el nivel intratumoral de un análogo de nucleósido coadministrado (p.ej. gemcitabina o derivado) en comparación con la ausencia de tratamiento. Por ejemplo, la gemcitabina intratumoral se aumenta en al menos o aproximadamente al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más. La cantidad de un taxano dirigido a un tumor, como un taxano unido a albúmina (p.ej. paclitaxel unido a albúmina) que se va a administrar para el tratamiento de una enfermedad o afección, por ejemplo, un cáncer o tumor sólido tal como un tumor rico en HA, se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden emplear ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosificación precisa, que se puede

determinar empíricamente, puede depender del taxano concreto, la formulación concreta (p.ej. formulación de nanopartículas o liposomas), la vía de administración, el tipo de enfermedad que se vaya a tratar y la gravedad de la enfermedad.

5 Típicamente, un taxano dirigido a un tumor, tal como un taxano unido a albúmina (p.ej. paclitaxel unido a albúmina) se administra a un sujeto con respecto al área de superficie corporal (ASC; m^2) del sujeto de entre o aproximadamente entre 1 mg/m^2 y 1.000 mg/m^2 , tal como entre o aproximadamente entre 10 mg/m^2 a 500 mg/m^2 , 50 mg/m^2 y 400 mg/m^2 , 25 mg/m^2 y 300 mg/m^2 , y generalmente al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 20 mg/m^2 , 30 mg/m^2 , 40 mg/m^2 , 50 mg/m^2 , 60 mg/m^2 , 70 mg/m^2 , 80 mg/m^2 , 90 mg/m^2 , 100 mg/m^2 , 150 mg/m^2 , 200 mg/m^2 , 250 mg/m^2 , 300 mg/m^2 . En algunos casos, se pueden administrar dosificaciones más bajas de un taxano dirigido a un tumor, tal como un taxano unido a albúmina (p.ej. paclitaxel unido a albúmina), a sujetos en comparación con formulaciones o regímenes de dosificación existentes. Por ejemplo, un taxano dirigido a un tumor, como un taxano unido a albúmina (p.ej. paclitaxel unido a albúmina), se administra a un sujeto en una cantidad que es al menos o aproximadamente al menos 50 mg/m^2 o 100 mg/m^2 , pero que es menos de 260 mg/m^2 , 200 mg/m^2 o 150 mg/m^2 . En otros ejemplos, la dosificación que se administra por administración es la misma que las dosificaciones y regímenes de dosificación existentes, pero el programa de dosificación se reduce de modo que se administra una menor cantidad de análogo de nucleósido por ciclo de administración. En otros casos, se pueden administrar dosificaciones más altas de un taxano dirigido a un tumor, tal como un taxano unido a albúmina (p.ej. paclitaxel unido a albúmina), a sujetos en comparación con formulaciones o regímenes de dosificación existentes. Por ejemplo, un taxano dirigido a un tumor, tal como un taxano unido a albúmina (p.ej. paclitaxel unido a albúmina), se administra a un sujeto en una cantidad que es al menos o aproximadamente al menos 300 mg/m^2 , tal como entre o aproximadamente entre 300 mg/m^2 y 1.000 mg/m^2 . Está dentro del nivel de un experto en la técnica convertir o determinar las dosificaciones correspondientes en mg/kg basándose en la altura y el peso de un sujeto. Por ejemplo, el ASC se determina por la fórmula (altura (cm) x peso (kg)/3600)^{1/2}. El ASC de un adulto promedio es de 1,73 m^2 .

25 En los ejemplos de la presente memoria, la terapia combinada contiene opcionalmente una administración adicional de un análogo de nucleósido (p.ej. una gemcitabina o derivado u otro análogo). La gemcitabina se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para lograr el suministro intratumoral. En ejemplos concretos, el análogo de nucleósido (p.ej. una gemcitabina o derivado u otro análogo) se coadministra en la terapia combinada de la presente invención en una cantidad para alcanzar un nivel intratumoral que aumente al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o más en comparación con el nivel intratumoral cuando se administra solo. La cantidad de un análogo de nucleósido (p.ej. gemcitabina, derivado del mismo u otro análogo descrito en la presente memoria) que se va a administrar para el tratamiento de una enfermedad o afección, por ejemplo, un cáncer o tumor sólido tal como un tumor rico en HA, se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden emplear ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosificación precisa, que se puede determinar empíricamente, puede depender del análogo de nucleósido concreto, la formulación concreta, la vía de administración, el tipo de enfermedad que se vaya a tratar y la gravedad de la enfermedad.

40 Típicamente, un análogo de nucleósido (p.ej. gemcitabina o derivado de la misma u otro análogo) se administra a un sujeto con respecto al área de superficie corporal (ASC; m^2) del sujeto de entre o aproximadamente entre 100 mg/m^2 y 2.500 mg/m^2 , tal como entre o aproximadamente entre 500 mg/m^2 y 2.000 mg/m^2 , 750 mg/m^2 y 1.500 mg/m^2 , 1.000 mg/m^2 y 1.500 mg/m^2 , o 500 mg/m^2 y 1.500 mg/m^2 , y generalmente al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 500 mg/m^2 , 600 mg/m^2 , 700 mg/m^2 , 800 mg/m^2 , 900 mg/m^2 , 1.000 mg/m^2 , 1.250 mg/m^2 , 1.500 mg/m^2 , 1.750 mg/m^2 , 2.000 mg/m^2 o más. En algunos casos, se pueden administrar dosificaciones más bajas de un análogo de nucleósido (p.ej. gemcitabina o derivado de la misma u otro taxano), a los sujetos en comparación con las formulaciones o regímenes de dosificación existentes. Por ejemplo, un análogo de nucleósido (p.ej. gemcitabina o su derivado u otro taxano), se administra a un sujeto en una cantidad que es al menos o aproximadamente al menos 200 mg/m^2 o 500 mg/m^2 , pero que es menor de 1.000 mg/m^2 o 1.250 mg/m^2 . En otros casos, la dosificación que se administra por administración es la misma que las dosis y los regímenes de dosificación existentes, pero el programa de dosificación se reduce de modo que se administra una menor cantidad de análogo de nucleósido por ciclo de administración. Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar la dosificación correspondiente en mg/kg .

55 Los agentes proporcionados en la presente memoria se pueden administrar por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral, intradérmica, oral o por otras vías de administración. La vía particular puede diferir entre los agentes administrados o puede ser la misma. Por ejemplo, se pueden administrar por vía subcutánea uno o más, o todos los agentes. En ejemplos concretos, en la presente memoria se contempla que una enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se puede administrar por vía subcutánea. En tales ejemplos, la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero se administra en un régimen de dosificación que permite 1-8 horas, tal como 1-2 horas, de absorción para que la enzima biodisponible alcance el torrente sanguíneo con el fin de producir una actividad tumoral similar a la un régimen de dosificación intravenoso simultáneo. En los ejemplos de la presente memoria, el taxano dirigido al tumor y/o análogo de nucleósido también se pueden administrar por vía subcutánea. La formulación o coformulación subcutánea concreta de los uno o más agentes se proporciona para

lograr una biodisponibilidad suficiente del agente y para minimizar las reacciones en el sitio de inyección.

En otro ejemplo, se pueden administrar por vía intravenosa uno o más, o todos los agentes. En tal ejemplo, se pueden administrar uno o más, o todos los agentes mediante embolada o infusión. El tiempo de embolada o infusión puede ser de 1 minuto a 60 minutos, y generalmente de aproximadamente 10 minutos a 40 minutos y no más de 60 minutos. Los agentes se pueden administrar mediante infusión concurrente o por infusión subsiguiente. En un ejemplo, dos de los agentes o los tres agentes administrados en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria se infunden simultáneamente. En tal ejemplo, los agentes administrados se proporcionan en la misma composición para infusión juntos en la misma bolsa. En otros casos, los agentes administrados se proporcionan en composiciones separadas, pero se combinan en una única bolsa como producto de infusión inmediatamente antes de la infusión. En un ejemplo adicional, los agentes administrados se infunden simultánea o casi simultáneamente o se infunden posteriormente, y se cuelgan en bolsas separadas para infusiones separadas.

3. Régimen de dosificación: frecuencia y ciclo de administración

El agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, se puede administrar antes, de manera simultánea o casi simultánea, sucesiva o intermitente con el taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, el agente antihialuronano, p.ej., la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y el taxano dirigido a un tumor se pueden coadministrar juntos o por separado. Si se administran por separado, los agentes se pueden administrar inmediatamente con una separación entre sí, tal como entre 30 segundos y 15 minutos el uno del otro, tal como menos de 15 minutos, 14 minutos, 12 minutos, 10 minutos, 5 minutos, 2 minutos, 1 minuto o 30 segundos el uno del otro. En otros casos, el agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, y el taxano dirigido a un tumor se administran sucesivamente y/o intermitentemente. En dichos ejemplos, el agente antihialuronano, p.ej., la enzima de degradación de hialuronano, se puede administrar primero o el taxano dirigido a un tumor se puede administrar primero. Generalmente, el agente antihialuronano, tal como una enzima de degradación de hialuronano, se administra antes del taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, el agente antihialuronano o enzima de degradación de hialuronano se administran al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas antes de la administración del taxano dirigido a un tumor.

En ejemplos de la terapia combinada de la presente memoria, el análogo de nucleósido se puede administrar antes, de forma simultánea o casi simultánea, sucesiva o intermitente con el agente antihialuronano (p.ej., enzima de degradación de hialuronano) y/o taxano dirigido a un tumor. El análogo de nucleósido se puede coadministrar conjuntamente o por separado con uno o ambos del agente antihialuronano (p.ej., enzima de degradación de hialuronano) y/o taxano dirigido a un tumor. Si se administran por separado, el análogo de nucleósido se puede administrar inmediatamente antes o después de la administración del agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano y/o el taxano dirigido a un tumor, por ejemplo administrado entre 30 segundos y 15 minutos el uno del otro, tal como menos de 15 minutos, 14 minutos, 12 minutos, 10 minutos, 5 minutos, 2 minutos, 1 minuto o 30 segundos de diferencia del agente antihialuronano (p. ej., enzima de degradación de hialuronano) y/o taxano dirigido a un tumor. Generalmente, el análogo de nucleósido se administra después del agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano. En algunos casos, el análogo de nucleósido se administra después del agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano y el taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, el análogo de nucleósido se administra al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas después de la administración del agente antihialuronano (p.ej., enzima de degradación de hialuronano) y/o taxano dirigido a un tumor.

En un ejemplo de la presente memoria, el agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano, se administra por separado de los otros agentes y se administra inmediatamente antes o después del taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, la enzima de degradación de hialuronano se administra menos de 15 minutos, 14 minutos, 12 minutos, 10 minutos, 5 minutos, 2 minutos, 1 minuto o 30 segundos antes o después del taxano dirigido a un tumor. En dichos ejemplos, el análogo de nucleósido se administra después del agente antihialuronano (p.ej., enzima de degradación de hialuronano) y el taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, el análogo de nucleósido se administra al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano y del taxano dirigido a un tumor.

En otro ejemplo, el agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano, se administra antes del taxano dirigido a un tumor, que se administra antes del análogo de nucleósido. Por ejemplo, el agente antihialuronano (p.ej., enzima de degradación de hialuronano) se administra al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12

horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas antes de la administración del taxano dirigido a un tumor. En dicho ejemplo, el análogo de nucleósido se administra al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas o 48 horas después de la administración del taxano dirigido a un tumor.

La frecuencia y el momento de la administración, y las cantidades de dosificación, se pueden administrar periódicamente durante un ciclo de administración para mantener un efecto continuo y/o a largo plazo de los agentes activos durante un período de tiempo deseado. Las combinaciones o composiciones se pueden administrar por hora, día, semana, mes, año o una vez. La duración del ciclo de administración se puede determinar empíricamente, y depende de la enfermedad que se vaya a tratar, la gravedad de la enfermedad, el paciente concreto y otras consideraciones dentro del nivel del conocimiento práctico del médico a cargo. El tiempo de tratamiento con una terapia combinada proporcionada en la presente memoria puede ser de una semana, dos semanas, un mes, varios meses, un año, varios años o más. Las dosificaciones se pueden dividir en una pluralidad de ciclos de administración durante el curso del tratamiento. Por ejemplo, una enzima hialuronidasa modificada se puede administrar dos veces a la semana durante un período de un año o más. Si los síntomas de la enfermedad persisten en ausencia de tratamiento interrumpido, el tratamiento puede continuarse durante un período de tiempo adicional. Durante el transcurso del tratamiento, se pueden controlar las pruebas de toxicidad o efectos secundarios relacionados con la enfermedad o el tratamiento.

Además, el ciclo de administración se puede adaptar para agregar períodos de tratamiento interrumpido a fin de proporcionar un período de descanso de la exposición a los agentes. El tiempo de interrupción del tratamiento puede ser por un tiempo predeterminado o se puede determinar empíricamente según cómo responda el paciente o según los efectos secundarios observados. Por ejemplo, el tratamiento puede interrumpirse durante una semana, dos semanas, un mes o varios meses. En general, el período de tratamiento interrumpido se integra en un ciclo de régimen de dosificación para un paciente.

Por ejemplo, un régimen de dosificación ilustrativo es un ciclo de tratamiento o ciclo de administración de 28 días. El agente, tal como el agente antihialuronano, por ejemplo, enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero, taxano dirigido a un tumor y/o análogo de nucleósido, se pueden administrar una vez a la semana o dos veces a la semana. Por ejemplo, el agente se puede administrar durante las primeras 3 semanas, una vez a la semana o dos veces a la semana, seguido de una semana sin dosificación. Así, por ejemplo, a un paciente se le pueden administrar dosis del agente dos veces a la semana los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 (o los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15), seguido de una semana de interrupción del tratamiento, en el transcurso del ciclo de 28 días. En otro ejemplo, a un paciente se le pueden administrar dosis del agente una vez a la semana los días 1, 8 y 16, seguido de una semana de tratamiento interrumpido en el transcurso del ciclo de 28 días. En otro ejemplo, el agente se puede administrar durante los 28 días completos una vez a la semana o dos veces a la semana. Así, por ejemplo, a un paciente se le pueden administrar dosis del agente dos veces a la semana los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 21 y 24 (o los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21 o 25) durante el ciclo completo de 28 días. En otros ejemplos, a un paciente se le pueden administrar dosis del agente una vez a la semana los días 1, 8, 16 o 24 durante el ciclo completo de 28 días. Se entiende que la descripción anterior es únicamente para fines de ilustración y que pueden emplearse variaciones de lo anterior. Además, se pueden aplicar ciclos de administración similares a todos los agentes administrados, o cada agente administrado se puede emplear en su propio régimen de dosificación en la terapia combinada proporcionada en la presente memoria.

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

Generalmente, el momento de administración del análogo de nucleósido, por ejemplo gemcitabina o derivado, es típicamente una función del ciclo de administración del agente antihialuronano, p.ej., enzima de degradación de hialuronano conjugada con polímero y/o taxano dirigido a un tumor. Por ejemplo, el análogo de nucleósido se puede administrar después de la primera administración del agente antihialuronano, tal como la enzima de degradación de hialuronano y/o taxano dirigido a un tumor en un ciclo de administración, y/o después de uno o más de las siguientes administraciones en el ciclo. En otros ejemplos, el análogo de nucleósido se administra después de cada administración posterior del agente antihialuronano (p.ej., enzima de degradación de hialuronano) y/o taxano dirigido a un tumor en el ciclo, después de cada administración posterior de la enzima de degradación de hialuronano y/o taxano dirigido a un tumor en el ciclo, o se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes durante el ciclo de administración del agente antihialuronano, p. ej. enzima de degradación de hialuronano y/o taxano dirigido a un tumor. En algunos ejemplos, el análogo de nucleósido solo se administra una vez por ciclo de administración del agente antihialuronano, p.ej. enzima de degradación de

hialuronano y/o taxano dirigido a un tumor. En un ejemplo adicional, el análogo de nucleósido se administra intermitentemente entre ciclos de administración. Por ejemplo, el análogo de nucleósido no se administra durante el primer ciclo de administración, pero se administra durante un segundo ciclo, seguido de omisión del tercer ciclo y se administra de nuevo durante un cuarto ciclo, etc. o cualquier variación de los mismos.

En ejemplos concretos de la terapia combinada de la presente invención, los métodos incluyen administrar un agente antihialuronano y un taxano dirigido a un tumor simultáneamente o casi simultáneamente, por ejemplo de forma concomitante. El agente antihialuronano y el taxano dirigido a un tumor se pueden administrar con una frecuencia de administración de dos veces a la semana o una vez a la semana durante un número predeterminado de semanas. En particular, el agente antihialuronano se administra dos veces por semana y el taxano dirigido a un tumor se administra una vez a la semana. Opcionalmente, también se puede administrar un análogo de nucleósido en la terapia combinada. Por ejemplo, el análogo de nucleósido se administra una vez a la semana durante un número predeterminado de semanas, y típicamente el análogo de nucleósido se administra una semana después de la administración del agente antihialuronano y del taxano dirigido a un tumor. El método también puede incluir la administración de un corticosteroide antes, simultáneamente a, intermitentemente o después de la administración del agente antihialuronano. El ciclo de administración puede ser durante cualquier período de tiempo, y está dentro del nivel del médico o facultativo a cargo. Por lo general, el número predeterminado de semanas es de 3 semanas o 4 semanas, pero puede ser más prolongado. El ciclo de administración puede repetirse una pluralidad de veces dependiendo del estado de la enfermedad y la respuesta del sujeto.

4. Tratamientos combinados adicionales

La terapia combinada proporcionada en la presente memoria se puede utilizar sola o combinada adicionalmente con otras terapias o tratamientos. Las combinaciones o composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden coformular o coadministrar junto con, antes de, intermitentemente con, o después de, otros agentes o tratamientos terapéuticos o farmacológicos, tales como procedimientos. Por ejemplo, tales agentes incluyen, pero sin limitación, otros agentes biológicos, agentes anticancerosos, compuestos de molécula pequeña, agentes dispersantes, anestésicos, vasoconstrictores y cirugía, y combinaciones de los mismos. Tales agentes también pueden incluir uno o más agentes para mejorar, reducir o prevenir los efectos secundarios. En algunos casos, la terapia combinada se puede utilizar combinada con uno o más tratamientos contra el cáncer que eliminan el tumor primario o que inmunosuprimen al sujeto antes del tratamiento. Por ejemplo, se puede utilizar quimioterapia o radioterapia adicional además de la terapia combinada proporcionada en la presente memoria. Tal terapia adicional puede tener el efecto de debilitar el sistema inmunitario de un sujeto. En otros ejemplos, pueden no ser necesarias la eliminación quirúrgica y/o la terapia de debilitamiento del sistema inmunitario. Otros métodos ilustrativos que se pueden combinar incluyen la administración de un compuesto que disminuye la tasa de proliferación del tumor o células neoplásicas sin debilitar el sistema inmunitario (p.ej., administrando compuestos supresores de tumores o administrando compuestos específicos de células tumorales) o administrando un compuesto inhibidor de la angiogénesis.

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

a. Corticosteroides

La terapia combinada proporcionada en la presente memoria se puede utilizar sola o combinada adicionalmente con uno o más corticosteroides. Se administra un corticosteroide en una cantidad que es terapéuticamente eficaz para mejorar o reducir uno o más efectos adversos de la administración de enzimas de degradación de hialuronano conjugadas con polímero u otro agente, en particular, efectos musculoesqueléticos adversos. Una cantidad terapéuticamente eficaz es la dosificación suficiente para mejorar, prevenir, eliminar o reducir uno o más síntomas o efectos adversos. Los indicadores de mejora o pretratamiento satisfactorio incluyen la determinación del fracaso para manifestar una puntuación relevante en la escala CTCAE o un cambio en la clasificación o gravedad en la escala CTCAE.

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

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

En general, se puede utilizar cualquier corticosteroide, p.ej., glucocorticoide, en los métodos o combinaciones proporcionados en la presente memoria. Los glucocorticoides incluyen glucocorticoides sintéticos y no sintéticos. Los glucocorticoides ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: alclometasonas, algestonas, beclometasonas (p.ej. dipropionato de beclometasona), betametasona (p.ej. 17-valerato de betametasona, acetato sódico de betametasona, fosfato sódico de betametasona, valerato de betametasona), budesonidas, clobetasoles (p.ej. propionato de clobetasol), clobetasonas, clocortolonas (p.ej. pivalato de clocortolona), cloprednol, corticosteronas, cortisonas e hidrocortisonas (p.ej. acetato de hidrocortisona), cortivazoles, deflazacorts, desonidas, desoximetasonas, dexametasonas (p.ej. dexametasona 21-fosfato, acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona), diflorasonas (p.ej. diacetato de diflorasona), diflucortolonas, difluprednatos, enoxolonas, fluazacorts, flucoronidas, fludrocortisonas (p.ej., acetato de fludrocortisona), flumetasonas (p.ej. pivalato de flumetasona), flunisolida, fluocinolonas (p.ej. acetónido de fluocinolona), fluocinonidas, fluocortinas, fluocortolonas, fluorometolonas (p.ej. acetato de fluorometolona), fluperolonas (p.ej., acetato de fluperolona), fluprednidenos, fluprednisolonas, flurandrenolidas, fluticasonas (p.ej. propionato de fluticasona), formocortales, halcinonidas, halobetasoles, halometasonas, halopredonas, hidrocortamatos, hidrocortisonas (p.ej. hidrocortisona 21-butilato, aceponato de hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, hemisuccinato de hidrocortisona, probutato de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona), etabonato de loteprednol, mazipredonas, medrisonas, meprednisonas, metilprednisolonas (aceponato de metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, hemisuccinato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona), mometasonas (p.ej., furoato de mometasona), parametasonas (p.ej., acetato de parametasona), prednicarbato, prednisolonas (p.ej. 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, 21-hemisuccinato de prednisolona, acetato de prednisolona; farnesilato de prednisolona, hemisuccinato de prednisolona, prednisolona-21 (beta-D-glicurónido), metasulfobenzato de prednisolona, esteagato de prednisolona, tebutato de prednisolona, tetrahidroftalato de prednisolona), prednisonas, prednivalas, prednolidenos, rimexolonas, tixocorticos, triamcinolonas (p.ej. acetónido de triamcinolona, benetonido de triamcinolona, hexacetónido de triamcinolona, 21-palmitato de acetónido de triamcinolona, diacetato de triamcinolona). Estos glucocorticoides y las sales de los mismos se comentan en detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (16ª ed. 1980).

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

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

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

La dosificación precisa y la duración del tratamiento se pueden determinar empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la

administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente memoria son meramente ilustrativos y no se pretende que limiten su alcance. En general, los regímenes de dosificación se seleccionan para limitar la toxicidad, y en la presente memoria se seleccionan para mejorar los efectos secundarios adversos. Cabe señalar que el médico a cargo sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia a una dosis menor debido a la toxicidad, o disfunciones en la médula ósea, el hígado o el riñón u otro tejido. Por el contrario, el médico a cargo también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera la adecuada (excluyendo los efectos secundarios tóxicos). La administración de un agente terapéutico no debe exceder los niveles de dosificación máximos establecidos por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos o publicados en Physician's Desk Reference.

Generalmente, la dosis de corticosteroide administrada depende del corticosteroide específico, ya que existe una diferencia de potencia entre diferentes corticosteroides (véase la Tabla 4 a continuación). El corticosteroide, o glucocorticoide, por ejemplo dexametasona, se puede administrar por vía oral (comprimidos, líquido o concentrado líquido) PO, por vía intravenosa (IV) o intramuscular. El corticosteroide se administra típicamente en forma de bolo, pero muchos se administran durante un período de tiempo, siempre que la dosis sea eficaz para mejorar uno o más efectos secundarios asociados con la administración del agente antihialuronano, por ejemplo, una hialuronidasa PEGilada.

Tabla 4. Administración de glucocorticoides	
Glucocorticoide (vía)	Potencia equivalente (mg)
Hidrocortisona (IV o PO)	20
Prednisona	5
Prednisolona (IV o PO)	5
Succinato sódico de metilprednisolona (IV)	4
Dexametasona (IV o PO)	0,5-0,75

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

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

La administración de la dosificación administrada puede variar siempre que la administración del corticosteroide mejore uno o más efectos secundarios adversos asociados con la administración de la enzima de degradación de hialuronano. En un ejemplo, la dosificación de glucocorticoide, por ejemplo, dexametasona, se administra a dosis sucesivamente más bajas por ciclo de tratamiento. Por lo tanto, en tales regímenes de tratamiento, la dosis de corticosteroide se reduce. Por ejemplo, la dexametasona se administra antes de la administración de una enzima de degradación de hialuronano, a una dosis inicial de 4 mg, y después de cada administración sucesiva de la enzima de degradación de hialuronano, la dosis de dexametasona disminuye, de modo que la dosis sea de 3 mg para la próxima administración de la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. hialuronidasa PEGilada, a continuación 2 mg por administración de agente antihialuronano, p.ej. hialuronidasa PEGilada, y a continuación 1 mg por administración de agente antihialuronano, p.ej. hialuronidasa pegilada. Se contempla cualquier dosis siempre que la dosis del corticosteroide sea eficaz para reducir uno o más efectos secundarios asociados con la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. una hialuronidasa PEGilada.

El tiempo de administración puede variar siempre que la administración del corticosteroide mejore uno o más efectos

secundarios adversos asociados con la administración de la enzima de degradación de hialuronano, tal como una hialuronidasa PEGilada. El corticosteroide se puede administrar de forma sucesiva, de forma intermitente, al mismo tiempo o en la misma composición que la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. enzima de degradación de hialuronano PEGilada. Por ejemplo, el corticosteroide se puede administrar antes, durante, simultáneamente o después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. hialuronidasa PEGilada. En otro ejemplo, el corticosteroide y la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. la hialuronidasa PEGilada se administran de forma intermitente. En general, el corticosteroide se administra antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. hialuronidasa PEGilada. Por ejemplo, el corticosteroide, p.ej., el glucocorticoide, tal como la dexametasona, se puede administrar o se puede administrar aproximadamente 0,5 minutos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas o más antes de la administración del agente antihialuronano, por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano PEGilada.

En algunos ejemplos, el corticosteroide se administra al mismo tiempo que la administración de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano PEGilada. En este ejemplo, el corticosteroide se puede administrar junto con, o por separado de, la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. una hialuronidasa PEGilada. Típicamente, el corticosteroide se administra por separado de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo, una enzima de degradación de hialuronano PEGilada. En otros ejemplos, el corticosteroide se administra o se administra aproximadamente 0,5 minutos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas o más después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo una enzima de degradación de hialuronano PEGilada.

En un ejemplo, el corticosteroide se administra antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo, una hialuronidasa PEGilada. Por ejemplo, el corticosteroide, p.ej., el glucocorticoide, por ejemplo, dexametasona, se administra 1 hora antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. una hialuronidasa PEGilada. En otro ejemplo, el corticosteroide se administra 5 minutos antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. una enzima de degradación de hialuronano PEGilada. En otro ejemplo, el corticosteroide se administra antes y después de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. una hialuronidasa PEGilada. En este ejemplo, el corticosteroide, tal como la dexametasona, se administra de uno a cinco minutos inmediatamente antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. una enzima de degradación de hialuronano PEGilado y ocho horas después de la administración del agente antihialuronano, p.ej. una enzima de degradación de hialuronano PEGilada. En otro ejemplo, se administra un corticosteroide, tal como dexametasona, una hora antes de la administración de la enzima de degradación de hialuronano, p.ej. una enzima de degradación de hialuronano PEGilada y de ocho a doce horas después de la administración del agente antihialuronano, p.ej. una enzima de degradación de hialuronano PEGilada.

Se contempla cualquier régimen de dosificación siempre que el tiempo de dosificación del corticosteroide mejore los uno o más efectos secundarios asociados con la administración de la enzima de degradación de hialuronano, por ejemplo una hialuronidasa PEGilada. Además, la dosis o el régimen de dosificación de corticosteroide es uno que no interfiere ni reduce el efecto terapéutico de la enzima de degradación de hialuronano u otro agente en las composiciones y combinaciones proporcionadas en la presente memoria, incluyendo en el tratamiento de un cáncer o tumor sólido.

b. Agentes contra el cáncer y otros tratamientos

La terapia combinada proporcionada en la presente memoria se puede utilizar sola o combinada adicionalmente con otros agentes anticancerosos. El o los agentes o el tratamiento o los tratamientos anticancerosos pueden ser cirugía, radiación, fármacos, agentes quimioterapéuticos, polipéptidos, anticuerpos, péptidos, moléculas pequeñas o vectores de terapia génica, virus o ADN.

Los ejemplos de agentes anticancerosos que se pueden administrar después, coincidentes con o antes de la administración de la combinación de la presente invención incluyen, pero no se limitan a Acivicinas; Avicina; Aclarrubicinas; Acodazoles; Acroninas; Adozelesinas; Aldesleuquinas; Alemtuzumab; Alitretinoinas (Ácido 9-Cis-Retinoico); Alopurinoles; Altretaminas; Alvocidib; Ambazonas; Ambomininas; Ametantronas; Amifostinas; Aminoglutetimidias; Amsacrinas; Anastrozoles; Anaxironas; Ancitabinas; Antramycinas; Apazicuonas; Argimesnas; Trióxidos de arsénico; Asparraginasas; Asperlinas; Atrimustinas; Azacitidinas; Azetepas; Azotomicinas; Banoxantronas; Batabulinas; Batimastat; BCG Vivo; Benaxibinas; Bendamustinas; Benzodepas; Bexarotenos; Bevacizumab; Bicalutamidas; Bietaserpinas; Biricodar; Bisantrénos; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesinas; Bleomicinas; Bortezomib; Brequinar; Bropiriminas; Budotitanos; Busulfanos; Cactinomicinas; Calusteronas; Canertinib; Capecitabinas; Caracemidas; Carbetímeros; Carboplatinos; Carbocuanas; Carmofur; Carmustinas con Polifeprosan; Carmustinas; Carrubicinas; Carzelesinas; Cedefingoles; Celecoxib; Cemadotinas; Clorambucilos;

Cioteronel; Cirolemicinas; Cisplatino; Cladribinas; Clanfenur; Clofarabinas; Crisnatol; Ciclofosfamid; Citarabina
 Liposomales; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomycin; Darbepoietina Alfa; Daunorrubicina Liposomales;
 Daunorrubicina/Daunomicina; Daunorrubicina; Decitabina; Denileucina Diftitox; Dexniguldipina; Dexonaplatino;
 5 Dexrazoxano; Dezaguanina; Diaziquona; Dibrospidium; Dienogest; Dinalina; Disermolida; Docetaxel;
 Dofequidar; Doxifluridina; Doxorubicina Liposomales; Doxorubicina HCL; inyección de Doxorubicina HCL
 liposomal; Doxorubicina; Droloxifeno; Propionatos de Dromostanolona; Duazomicina; Ecomustina; Edatrexato;
 Edotecarina; Eflornitina; Elacrida; Elinafida; Soluciones B de Elliott; Elsamitricina; Emitefur; Enloplatinos;
 Enpromatos; Enzastaurina; Epiropidina; Epirubicina; Epoetina alfa; Eptaloprost; Erbulozoles; Esorubicina;
 Estramustina; Etanidazole; Etoglucidos; Fosfatos de Etopósido; Etoposidos VP-16; Etopósidos; Etoprina;
 10 Exemestano; Exisulind; Fadrozoles; Fazarabina; Fenretinida; Filgrastim; Floxuridina; Fludarabina;
 Fluorouracilo; 5-fluorouracilo; Fluoximesterona; Flurocitabina; Fosquidone; Fostriecina; Fostriecina;
 Fotretamina; Fulvestrant; Galarrubicina; Galocitabina; Gemcitabina; Gemtuzumab/Ozogamicina; Geroquinol;
 Gimitecano; Gimeracilo; Gloxazona; Glufosfamid; Acetatos de goserelina; Hidroxiurea;
 Ibritumomab/Tiuxetano; Idarubicina; Ifosfamid; Ilmofosina; Ilomastat; Mesilato de imatinib; Imexona;
 15 Impropumolam; Indisulam; Inprocuona; Interferones alfa-2; Interferones alfa-2b; Interferones Alfa; Interferones Beta;
 Interferones Gamma; Interferones; Interleucina-2 y otras interleucinas (incluyendo las interleucinas recombinantes);
 Intoplicina; Iobenguanos [131-1]; Iproplatino; Irinotecán; Irsogladina; Ixabepilona; Cetotrexato; L-alanosina;
 Lanreotida; Lapatinib; Ledoxantrona; Letrozoles; Leucovorina; Leuprolida; Leuprorelina (Leuprorelides);
 Levamisole; Lexacalcitole; Liarozoles; Lobaplatino; Lometrexole; Lomustina/CCNU; Lomustina; Lonafamib;
 20 Losoxantrona; Lurtotecán; Mafosfamid; Manosulfano; Marimastat; Masoprocol; Maytansina; Mecloretamina;
 Mecloretamina/mostaza nitrogenada; Acetatos de Megestrol; Megestrol; Melengestrol; Melfalán; Melfalan IL-
 PAM; Menogaril; Mepitiostano; Mercaptopurina; 6-Mercaptopurina; Mesna; Metesind; Metotrexato;
 Metoxsaleno; Metomidato; Metoprina; Meturedepa; Miboplatina; Miproxifeno; Misonidazole; Mitindomida;
 Mitocarcina; Mitocromina; Mitoflaxona; Mitogilina; Mitoguzona; Mitomalcina; Mitomicina C; Mitomicina;
 25 Mitonafida; Mitoquidona; Mitosper; Mitotano; Mitoxantrona; Mitozolomida; Mivobulina; Mizoribina;
 Mofaroteno; Mopidamole; Mubritinib; Ácidos micofenólicos; Fenpropionatos de Nandrolona; Nedaplatino;
 Nelzarabina; Nemorrubicina; Nitracrina; Nocodazole; Nofetumomab; Nogalamicina; Nolatrexat;
 Nortopixantrona; Octreótido; Oprelvequina; Ormaplatino; Ortataxel; Oteracilo; Oxaliplatino; Oxisurano;
 Oxofenarsina; Paclitaxel; Pamidronato; Patubilona; Pegademasa; Pegaspargasa; Pegfilgrastim; Peldesina;
 30 Peliomicina; Pelitrexole; Pemetrexat; Pentamustina; Pentostatina; Peplomicina; Perfosfamid; Perifosina;
 Picoplatino; Pinafida; Pipobromano; Pisosulfano; Pirfenidona; Piroxantrona; Pixantrona; Plevitrexat;
 Plicamicida mitramicina; Plicamicina; Plomestano; Plomestano; Porfímero sódico; Porfímeros; Porfíromicina;
 Prednimustina; Procarbazina; Propamidina; Prospidio; Pumitepa; Puomicina; Pirazofurina; Quinacrina;
 Ranimustina; Rasburicasa; Riboprina; Ritrosulfano; Rituximab; Rogletimida; Roquinimex; Rufocromomicina;
 35 Sabarubicina; Safingole; Sargramostim; Satraplatino; Sebriplatino; Semustina; Simtrazeno; Sizofirano;
 Sobuzoxano; Sorafenib; Esparfosato; Ácidos esparfósicos; Esparsomicina; Espirogermanio; Espiromustina;
 Espiroplatina; Espiroplatina; Escualamina; Estreptonigrina; Estreptovaricina; Estreptozocina; Sufosfamid;
 Sulofenur; Malato de Sunitinib; 6-tioguanina (6-TG); Tacedinalina; Talcos; Talisomicina; Talimustina;
 Tamoxifeno; Tariquidar; Tauromustina; Tecogalano; Tegafur; Teloxantrona; Temoporfina; Temozolomida;
 40 Teniposidos/VM-26; Teniposido; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiamiprina;
 Tiazofurina; Tilomisolet; Tilonas; Timcodar; Timonac; Tirapazamina; Topixantrona; Topotecán; Toremifeno;
 Tositumomab; Trabectedina (Ecteinascidina 743); Trastuzumab; Trestolona; Tretinoína/ATRA; Triciribina;
 Trilostano; Trimetrexato; Tetranitrato de Triplatin; Triptorelina; Tubulozoles; Ubenimex;
 Mostaza de Uracilo; Uredapa; Valrubicina; Valspodar; Vapreotida; Verteporfina; Vinblastina; Vincristina;
 45 Vindesina; Vinepidina; Vinflunina; Vinformida; Vinglicinato; Vinleucinoles; Vinleucosinas; Vinorelbina;
 Vinrosidina; Vintriptoles; Vinzolidina; Vorozoles; Xantomicina A (Guameciclina); Zeniplatino; Zilasorb [2-H];
 Zinostatina; Zoledronato; Zorrubicina; y Zosuquidar, por ejemplo:

Aldesleuquina (p.ej. PROLEUKIN®); Alemtuzumab (p.ej. CAMPATH®); Alitretinoína (p.ej. PANRETIN®);
 50 Alopurinol (p.ej. ZYLOPRIM®); Altretamina (p.ej. HEXALEN®); Amifostina (p.ej. ETHYOL®);
 Anastrozole (p.ej. ARIMIDEX®); Trióxidos de arsénico (p.ej. TRISENOX®); Asparaginasas (p.ej.
 ELSPAR®); BCG Vivo (p.ej. TICE® BCG); Bexaroteno (p.ej. TARGRETIN®); Bevacizumab (AVASTIN®);
 Bleomicina (p.ej. BLENOXANE®); Busulfán intravenoso (p.ej. BUSULFEX®); Busulfán oral (p.ej.
 MYLERAN®); Calusterona (p.ej. METHOSARB®); Capecitabina (p.ej. XELODA®); Carboplatino (p.ej.
 55 PARAPLATIN®); Carmustina (p.ej. BCNU®, BiCNU®); Carmustina con Polifeprosano (p.ej. Oblea de
 GLIADEL®); Celecoxib (p.ej. CELEBREX®); Clorambucilo (p.ej. LEUKERAN®); Cisplatino (p.ej.
 PLATINOL®); Cladribina (p.ej. LEUSTATIN®, 2-CdA®); Ciclofosfamid (p.ej. CYTOXAN®, NEOSAR®);
 Citarabina (p.ej. CYTOSAR-U®); Citarabina Liposomales (p.ej. DepoCyt®); Dacarbazina (p.ej. DTIC-
 Dome); Dactinomycin (p.ej. COSMEGEN®); Darbepoietina Alfa (p.ej. ARANESP®); Daunorrubicina
 liposomales (p.ej., DANUOXOME®); Daunorrubicina/Daunomicina (p.ej. CERUBIDINE®); Denileucina
 60 Diftitox (p.ej. ONTAK®); Dexrazoxano (p.ej. ZINECARD®); Docetaxel (p.ej. TAXOTERE®); Doxorubicina
 (p.ej. ADRIAMYCIN®, RUBEX®); Doxorubicina Liposomal, incluyendo inyección de Doxorubicina HCL
 liposomal (p.ej. DOXIL®); Propionatos de Dromostanolona (p.ej. DROMOSTANOLONE® y MASTERONE®
 Injectable); Soluciones B de Elliott (p.ej. Elliott's B Solution®); Epirubicina (p.ej. ELLENCE®); Epoetina alfa

(p.ej. EPOGEN®); Estramustinas (p.ej. EMCYT®); Fosfatos de Etopósido (p.ej. ETOPOPHOS®); Etoposidos VP-16 (p.ej. VEPESID®); Exemestanos (p.ej. AROMASIN®); Filgrastim (p.ej. NEUPOGEN®); Floxuridinas (p.ej. FUDR®); Fludarabinas (p.ej. FLUDARA®); Fluorouracilo incl. 5-FU (p.ej. ADRUCIL®); Fulvestrant (p.ej. FASLODEX®); Gemcitabinas (p.ej. GEMZAR®); Gemtuzumab/Ozogamicina (p.ej. MYLOTARG®); Acetatos de goserelina (p.ej. ZOLADEX®); Hidroxiureas (p.ej. HYDREA®); Ibritumomab/Tiuxetan (p.ej. ZEVALIN®); Idarrubicinas (p.ej. IDAMYCIN®); Ifosfamidas (p.ej. IFEX®); Mesilatos de imatinib (p.ej. GLEEVEC®); Interferones alfa-2a (p.ej. ROFERON-A®); Interferones alfa-2b (p.ej. INTRON A®); Irinotecán (p.ej. CAMPTOSAR®); Letrozoles (p.ej. FEMARA®); Leucovorinas (p.ej. WELLCOVORIN®, LEUCOVORIN®); Levamisoles (p.ej. ERGAMISOL®); Lomustinas/CCNU (p.ej. CeeBU®); Mecloretaminas/mostazas nitrogenadas (p.ej. MUSTARGEN®); Acetatos de Megestrol (p.ej. MEGACE®); Melfalán/L-PAM (p.ej. ALKERAN®); Mercaptopurina, incluyendo 6-mercaptopurinas (6-MP; p.ej. PURINETHOL®); Mesna (p.ej. MESNEX®); Metotrexatos; Metoxsalenos (p.ej. UVADEX®); Mitomicinas C (p.ej. MUTAMYCIN®, MITOZYTREX®); Mitotanos (p.ej. LYSODREN®); Mitoxantronas (p.ej. NOVANTRONE®); Fenpropionatos de Nandrolona (p.ej. DURABOLIN-50®); Nofetumomab (p.ej. VERLUMA®); Oprelvequinas (p.ej. NEUMEGA®); Oxaliplatinos (p.ej. ELOXATIN®); Paclitaxel (p.ej. PAXENE®, TAXOL®); Pamidronatos (p.ej. AREDIA®); Pegademazas (p.ej. ADAGEN®); Pegaspargasas (p.ej. ONCASPAR®); Pegfilgrastim (p.ej. NEULASTA®); Pentostatinas (p.ej. NIPENT®); Pipobromanos (p.ej. VERCYTE®); Plicamicina/mitramicinas (p.ej. MITHRACIN®); Porfímeros sódicos (p.ej. PHOTOFRIN®); Procarbazinas (p.ej. MATULANE®); Quinacinas (p.ej. ATABRINE®); Rasburicasas (p.ej. ELITEK®); Rituximab (p.ej. RITUXAN®); Sargramostim (p.ej. PROKINE®); Estreptozocinas (p.ej. ZANOSAR®); Malatos de Sunitinib (p.ej. SUTENT®); Talcos (p.ej. SCLEROSOL®); Tamoxifenos (p.ej. NOLVADEX®); Temozolomidas (p.ej. TEMODAR®); Teniposidos/VM-26 (p.ej. VUMON®); Testolactonas (p.ej. TESLAC®); Tioguaninas incluyendo, 6-tioguanina (6-TG); Tiotepas (p.ej. THIOPLEX®); Topotecón (p.ej. HYCAMTIN®); Toremifenos (p.ej. FARESTON®); Tositumomab (p.ej. BEXXAR®); Trastuzumab (p.ej. HERCEPTIN®); Tretinoínas/ATRA (p.ej. VESANOID®); Mostazas de Uracilo; Valrubicinas (p.ej. VALSTAR®); Vinblastinas (p.ej. VELBAN®); Vincristinas (p.ej. ONCOVIN®); Vinorelbinas (p.ej. NAVELBINE®); y Zoledronatos (p.ej. ZOMETA®).

H. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1

35 Efecto antitumoral del tratamiento combinado con PEGPH20 y Nab-paclitaxel en un modelo de xenoinjerto de tumor de páncreas humano

Se evaluó un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas humano para determinar los efectos antitumorales de PEGPH20 combinada con paclitaxel unido a albúmina en nanopartículas (nab).

Se cultivaron células tumorales de la línea celular de cáncer de páncreas BxPC3 (American Tissue Culture Collection (ATCC) CRL-1687) hasta aproximadamente 80% de confluencia, se tripsinizaron, se recogieron y se lavaron una vez en HBSS (solución salina equilibrada de Hank, Mediatech Inc.). Antes de la inoculación, las células se lavaron dos veces con HBSS estéril, se contaron utilizando un dispositivo de recuento automatizado Nexcelom Cellometer (Nexcelom Bioscience; Lawrence, MA) que determina la concentración celular y la viabilidad mediante exclusión con Azul Tripán y se diluyeron con HBSS a una concentración de 1×10^8 células/mL en hielo antes de la inoculación a los animales. A ratones macho carentes de sistema inmunitario (ratones Atímicos NCr *nu/nu* Taconic Laboratories, Inc.) de aproximadamente 6 semanas de edad, se les inocularon por vía intramuscular (IM) 0,05 mL de suspensión celular, peritibialmente, en la pata trasera izquierda (adyacente al periostio tibial). Los tumores en los animales se evaluaron dos veces por semana y se dejaron crecer hasta un volumen tumoral medio de aproximadamente 350 - 400 mm³. Los volúmenes tumorales reales se determinaron utilizando el ultrasonido de alta resolución VisualSonics Vevo 770 (VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Canadá).

Los animales portadores de tumores se agruparon en 8 grupos de tratamiento de 8 animales por grupo y se trataron por vía intravenosa con: 1) vehículo (tampón API; 2) PEGPH20 (4,5 mg/kg); 3) nab-paclitaxel (3 mg/kg, dosis baja); 4) nab-paclitaxel (10 mg/kg, dosis moderada); 5) nab-paclitaxel (30 mg/kg, dosis alta); 6) PEGPH20 (4,5 mg/kg) + nab-paclitaxel (3 mg/kg); 7) PEGPH20 (4,5 mg/kg) + nab-paclitaxel (10 mg/kg); u 8) PEGPH20 (4,5 mg/kg) + nab-paclitaxel (30 mg/kg). La PEGPH20 y nab-paclitaxel se administraron por separado. Primero se administró PEGPH20 inmediatamente seguido de nab-paclitaxel. La dosis y frecuencia de los tratamientos fue cada 3 días para un total de 6 inyecciones a partir del Día 0 con un volumen de dosis de 0,1 mL/25 g de ratón, o 4,0 mL/kg (es decir, Días 0, 3, 6, 9, 12, 15).

Los volúmenes tumorales de todos los ratones se midieron capturando imágenes utilizando el sistema de ultrasonido VisualSonics 2 veces por semana. El volumen del tumor se calculó utilizando un programa de soporte lógico de

imágenes en modo 3D (VisualSonics® Vevo 770®, v 3.0.0). El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[1 - (T_n - T_0) / (C_n - C_0)] \times 100\%$$

En la ecuación anterior, T_n es el volumen tumoral promedio en el grupo de tratamiento el día "n" respectivo en el punto temporal indicado después del tratamiento; T_0 es el volumen tumoral promedio en el grupo de tratamiento el Día 0 antes del tratamiento; C_n es el volumen tumoral promedio en el grupo de control el día "n" respectivo en el punto temporal indicado después del tratamiento con el vehículo; y C_0 es el volumen tumoral promedio en el grupo de control el día 0 antes del tratamiento.

Los resultados se muestran en la Figura 1. Los resultados muestran que el nab-paclitaxel a dosis altas y moderadas inhibió el crecimiento tumoral, que mejoró en presencia de PEGPH20. Por ejemplo, en el último punto temporal en el que se midió el volumen tumoral, las dosis moderadas a altas de nab-paclitaxel (10 mg/kg y 30 mg/kg) inhibieron el crecimiento tumoral en 62% ($p < 0,01$) y 74% ($p < 0,01$), respectivamente, en comparación con el control de vehículo. En presencia de PEGPH20, la inhibición del crecimiento tumoral para los grupos de tratamiento con dosis de 10 mg/kg de nab-paclitaxel aumentó a 72% ($p < 0,01$) y para los grupos de tratamiento con la dosis de 30 mg/kg de nab-paclitaxel aumentó a 91% ($p < 0,01$). Este es un aumento mediado por PEGPH20 de la eficacia de 19% para la dosis moderada de nab-paclitaxel, y de 26% para la dosis alta de nab-paclitaxel. No se observó una inhibición sustancial del crecimiento tumoral en los grupos tratados con 4,5 mg/kg de PEGPH20 o en grupos tratados con 3 mg/kg de baja dosis de Nab-paclitaxel en presencia o ausencia de PEGPH20.

Ejemplo 2

Efecto antitumoral de tratamiento de combinación con PEGPH20, Nab-paclitaxel y gemcitabina en un modelo de xenoinjerto de tumor de páncreas humano

A. Inhibición del crecimiento tumoral

El modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas humano descrito en el Ejemplo 1 se utilizó para evaluar los efectos antitumorales de la terapia combinada de PEGPH20 y nab-paclitaxel combinada adicionalmente con el tratamiento con gemcitabina. Antes de realizar el estudio, se seleccionó una vía y un nivel de dosis para la gemcitabina. Para esto, los ratones portadores de tumores fueron tratados con dosis variables de gemcitabina (60 mg/kg, 120 mg/kg, 180 mg/kg y 240 mg/kg) una vez a la semana durante 21 días (día 0, 7, 14 y 21) y se controló el volumen tumoral como se describió anteriormente. Los resultados se representan en la Figura 2. Los resultados muestran que la gemcitabina inhibió el crecimiento tumoral a todas las dosis sometidas a ensayo en comparación con el vehículo solo. Se seleccionó una dosis subóptima de 180 mg/kg para su uso en estudios quimioterapéuticos combinados con PEGPH20 posteriores. Se seleccionaron dosis subóptimas tanto de gemcitabina como de nab-paclitaxel para evaluar los beneficios potenciales de combinar los tres agentes anticancerosos: PEGPH20, gemcitabina y nab-paclitaxel.

Los ratones portadores de tumores se agruparon en 8 grupos de tratamiento de 12 animales por grupo y se trataron con: 1) vehículo (tampón API); 2) PEGPH20 (4,5 mg/kg); 3) nab-paclitaxel (10 mg/kg); 4) gemcitabina (180 mg/kg); 5) PEGPH20 (4,5 mg/kg) + nab-paclitaxel (10 mg/kg); 6) PEGPH20 (4,5 mg/kg) + gemcitabina (180 mg/kg); 7) nab-paclitaxel (10 mg/kg) + gemcitabina (180 mg/kg); u 8) PEGPH20 (4,5 mg/kg) + nab-paclitaxel (10 mg/kg) + gemcitabina (180 mg/kg). La PEGPH20 y el nab-paclitaxel se administraron por vía intravenosa y la dosis y frecuencia de los tratamientos fueron 2 veces por semana (2 x sem.) durante un ciclo de dosis de cuatro semanas. La gemcitabina se administró por vía intraperitoneal 24 horas después de PEGPH20 y/o nab-paclitaxel cada 7 días durante tres semanas del ciclo de dosis. Dependiendo del grupo sometido a ensayo, el programa de dosificación para la administración de los agentes en un ciclo de cuatro semanas se establece en la Tabla 5.

Tabla 5: Horario de dosificación

Programa	Tratamiento
Día 0	vehículo o PEGPH20 ± nab-paclitaxel (cada uno intravenoso)
Día 1 (24 horas después de la administración del día 0)	gemcitabina (intraperitoneal)
Día 4	vehículo o PEGPH20 ± nab-paclitaxel (cada uno intravenoso)
Día 7	vehículo o PEGPH20 ± nab-paclitaxel (cada uno intravenoso)

Tabla 5: Horario de dosificación

Programa	Tratamiento
Día 8 (24 horas después de la administración del día 7)	gemcitabina (intraperitoneal)
Día 11	vehículo o PEGPH20 ± nab-paclitaxel (cada uno intravenoso)
Día 14	vehículo o PEGPH20 ± nab-paclitaxel (cada uno intravenoso)
Día 15 (24 horas después de la administración del día 14)	gemcitabina (intraperitoneal)
Día 18	vehículo o PEGPH20 ± nab-paclitaxel (cada uno intravenoso)
Día 21	vehículo o PEGPH20 ± nab-paclitaxel (cada uno intravenoso)
Día 25	vehículo o PEGPH20 ± nab-paclitaxel (cada uno intravenoso)

El volumen tumoral y la inhibición del crecimiento tumoral se determinaron como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 3. Los resultados muestran que gemcitabina sola, PEGPH20 sola y PEGPH20 + gemcitabina exhibieron cierta actividad antitumoral, pero que el efecto antitumoral fue mucho mayor en terapias que contenían nab-paclitaxel mostrando el mayor efecto antitumoral en animales tratados con PEGPH20, nab-paclitaxel y gemcitabina. La Tabla 6 representa los resultados como el porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al vehículo determinado a partir de las mediciones de volumen tumoral el día 26. Los resultados muestran que el tratamiento de animales con PEGPH20 además del tratamiento con nab-paclitaxel y gemcitabina dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral de 81% con respecto al vehículo, mientras que el tratamiento con nab-paclitaxel y gemcitabina sin PEGPH20 solo dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral de 66%. Por lo tanto, los resultados muestran que la adición de PEGPH20 a la terapia combinada de nab-paclitaxel y gemcitabina dio como resultado un aumento de eficacia de 23%.

Tabla 6: Efecto antitumoral de PEGPH20 combinada con gemcitabina y/o nab-paclitaxel

Tratamiento	Inhibición del crecimiento tumoral (% de control de vehículo)	valor p (con respecto al control de vehículo)
gemcitabina	25	0,0110
PEGPH20 + gemcitabina	38	<0,0001
PEGPH20	39	<0,0028
nab-paclitaxel	63	<0,0001
nab-paclitaxel + gemcitabina	66	<0,0001
PEGPH20 + nab-paclitaxel	71	<0,0001
PEGPH20 + nab-paclitaxel + gemcitabina	81	<0,0001

B. Tiempo medio de supervivencia

Después del primer ciclo de dosificación de cuatro semanas como se establece en la parte A, el ciclo de dosificación se repitió dos veces y se siguió el tiempo hasta el punto final de supervivencia a lo largo del tiempo. Brevemente, en cada ciclo de dosificación, los animales se trataron con vehículo o PEGPH20 (4,5 mg/ml) con o sin nab-paclitaxel (10 mg/kg) por vía intravenosa dos veces por semana durante cuatro semanas. En cada ciclo, a los grupos que recibieron gemcitabina se les administró gemcitabina (180 mg/kg) 24 horas después de PEGPH20 y/o nab-paclitaxel cada 7 días durante tres semanas del ciclo de dosis. El tiempo hasta el punto final de supervivencia, un sustituto de la supervivencia animal, se definió como (a) el tiempo hasta el volumen tumoral de más de 2000 mm³, (b) tiempo hasta una pérdida de peso superior a 20%, o (c) tiempo hasta la represión de los animales o la muerte.

Los resultados se muestran en la Figura 4 y la Tabla 7. Los resultados muestran que la mediana del tiempo de supervivencia hasta el punto final de los animales tratados solo con gemcitabina fue de 38 días, los animales

tratados con Nab-paclitaxel y gemcitabina fueron 52 días y los animales tratados con PEGPH20, nab-paclitaxel y gemcitabina fueron 68 días. Por lo tanto, los resultados muestran que la adición de PEGPH20 al tratamiento con nab-paclitaxel y gemcitabina aumentó el tiempo medio de supervivencia en comparación con cualquier otro tratamiento con un aumento de eficacia de 31% en comparación con el tratamiento con nab-paclitaxel y gemcitabina sin PEGPH20 y una mayor eficacia de 79% comparado con el tratamiento solo con gemcitabina.

Tabla 7: Tiempo medio de supervivencia	
Tratamiento	Tiempo medio de supervivencia (días)
gemcitabina	38
nab-paclitaxel + gemcitabina	52
PEGPH20 + nab-paclitaxel + gemcitabina	68 ^{*‡}
* Relativo al vehículo (p <0,0001)	
‡ Relativo a nab-paclitaxel + gemcitabina (p = 0,0008)	

C. Medición de biomarcadores tumorales

Los biomarcadores del antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9) y el antígeno carcinoembrionario (CEA) asociados con el cáncer de páncreas se analizaron para medir la respuesta terapéutica. Los animales se trataron como se describe en la parte A. Se recogió suero de animales satélite (n≤3) de cada grupo los días 0, 6, 13 y 20 del primer ciclo de dosificación. El CA19-9 humano se midió utilizando un kit ELISA para CA 19-9 (Núm. de catálogo CA199T, Calbiotech, Spring Valley, CA) y se midió el antígeno tumoral CEA utilizando un kit ELISA para CEA (Núm. de catálogo CE062T, Calbiotech, Spring Valley, CA)

Los resultados se muestran en la Figura 5. Los resultados muestran que la presencia del tratamiento con PEGPH20 dio como resultado una reducción de los marcadores medidos en todos los grupos de tratamiento. Por ejemplo, el día 20, el nivel de marcador CA19-9 detectado fue similar en todos los grupos tratados con PEGPH20 que oscilaba de aproximadamente 40 a 60 U/ml. Por el contrario, el nivel de marcador CA19-9 en animales tratados con nab-paclitaxel o nab-paclitaxel + gemcitabina fue aproximadamente el doble que el de los animales también tratados con PEGPH20 y fue de aproximadamente 110 U/ml. Los animales tratados solo con gemcitabina mostraron niveles de CA19-9 que eran aproximadamente similares al control solo de vehículo. Por lo tanto, los resultados muestran que los animales tratados con PEGPH20 + nab-paclitaxel presentaban una reducción de los niveles de CA19-9 en comparación con los animales tratados solo con Nab-paclitaxel; los animales tratados con PEGPH20 + gemcitabina presentaron una reducción de los niveles de CA19-9 en comparación con los animales tratados solo con gemcitabina; y los animales tratados con PEGPH20 + nab-paclitaxel + gemcitabina presentaron una reducción de los niveles de CA19-9 en comparación con los animales tratados solo con nab-paclitaxel + gemcitabina. Para los animales tratados con PEGPH20 + nab-paclitaxel + gemcitabina, el CA19-9 se redujo en 49% en comparación con los animales tratados con nab-paclitaxel + gemcitabina en ausencia de PEGPH20.

Los resultados fueron similares cuando se midió el marcador CEA. Utilizando este marcador, los resultados muestran que los niveles de CEA no se modificaron sustancialmente el día 20 en animales tratados solo con Nab-paclitaxel en comparación con el control de vehículo ya que el CEA se midió a aproximadamente 20 - 25 ng/mL en estos grupos. En los animales tratados con gemcitabina o nab-paclitaxel + gemcitabina hubo alguna reducción en el marcador CEA medido el día 20 a aproximadamente 15 ng/ml. En presencia de PEGPH20, el nivel de marcador que se midió se redujo considerablemente en comparación con los grupos de tratamiento sin PEGPH20. Por ejemplo, en animales tratados solo con PEGPH20, el CEA medido el día 20 fue aproximadamente 7-8 ng/ml. En los animales tratados con PEGPH20 + gemcitabina, PEGPH20 + nab-paclitaxel o PEGPH20 + nab-paclitaxel + gemcitabina, los niveles de CEA el día 20 fueron demasiado bajos para ser cuantificados mediante ELISA.

Ejemplo 3

Líneas celulares que expresan rHuPH20

A. Generación de una línea celular soluble inicial que expresa rHuPH20

Se transfectaron células de ovario de hámster chino (CHO) con el plásmido HZ24 (expuesto en SEQ ID NO: 52). El vector plasmídico HZ24 para la expresión de rHuPH20 soluble contiene una cadena principal del vector pCI (Promega), ADN que codifica los aminoácidos 1-482 de hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO: 49), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón. La cadena principal del vector pCI también incluye ADN que codifica el gen de resistencia a betalactamasa (AmpR), un origen de replicación f1, una región potenciadora temprana inmediata/promotora de citomegalovirus

(CMV), un intrón quimérico y una señal de poliadenilación tardía SV40 (SV40). El ADN que codifica la construcción rHuPH20 soluble contiene un sitio NheI y una secuencia consenso Kozak antes del ADN que codifica la metionina en la posición 1 de la secuencia señal de 35 aminoácidos nativa de PH20 humana, y un codón de parada después del ADN que codifica la tirosina que corresponde a la posición de aminoácido 482 de la hialuronidasa PH20 humana expuesta en SEC ID NO: 1), seguido de un sitio de restricción BamHI. La construcción pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por lo tanto, da como resultado una única especie de ARNm impulsada por el promotor de CMV que codifica los aminoácidos 1-482 de PH20 humana (expuesta en SEQ ID NO: 3) y los aminoácidos 1-186 de dihidrofolato reductasa de ratón (expuesta en SEQ ID NO: 53), separadas por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

Las células CHO no transfectadas que crecen en medios CD-CHO modificado de GIBCO para células DHFR(-), complementados con Glutamina 4 mM y Pluronic F68/L 18 mL/L (Gibco), se sembraron a $0,5 \times 10^6$ células/mL en un matraz oscilante para preparar la transfección. Las células se cultivaron a 37°C en CO₂ al 5% en una incubadora humidificada, con movimiento oscilante a 120 rpm. Las células CHO no transfectadas en crecimiento exponencial se sometieron a ensayo para determinar la viabilidad antes de la transfección.

Se sedimentaron 60 millones de células viables del cultivo de células CHO no transfectadas y se resuspendieron a una densidad de 2×10^7 células en 0,7 mL de 2x tampón de transfección (2x HeBS: Hepes 40 mM, pH 7,0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,4 mM, dextrosa 12 mM). A cada alícuota de células resuspendidas, se le añadieron 0,09 mL (250 µg) del plásmido HZ24 lineal (linealizado mediante digestión durante la noche con Cla I (New England Biolabs), y las soluciones de células/ADN se transfirieron a cubetas de electroporación BTX (Gentronics) con espacios de 0,4 cm a temperatura ambiente. Se realizó una electroporación de control negativo sin ADN plasmídico mezclado con las células. Las mezclas de célula/plásmido se sometieron a electroporación con una descarga de condensador de 330 V y 960 µF o a 350 V y 960 µF.

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

Dos días después de la electroporación, se retiraron 0,5 mL de los medio de cultivo tisulares de cada pocillo y se sometieron a ensayo para determinar la presencia de actividad de hialuronidasa utilizando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 6. Las células que expresaban los niveles más altos de actividad hialuronidasa se recogieron del pocillo de cultivo tisular, se sometieron a recuento y se diluyeron de 1×10^4 a 2×10^4 células viables por mL. Se transfirió una alícuota de 0,1 mL de la suspensión celular a cada pocillo de cinco placas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron cien microlitros de medios CD-CHO (GIBCO) que contenían suplemento GlutaMAX™ -1 4 mM (GIBCO™, Invitrogen Corporation) y sin suplementos de hipoxantina y timidina a los pocillos que contenían las células (volumen final 0,2 mL).

Se identificaron diez clones de las 5 placas cultivadas sin metotrexato. Seis de estos clones HZ24 se expandieron en cultivo y se transfirieron a matraces de agitación como suspensiones de células individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 y 4D10 se cultivaron en placa en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos utilizando una estrategia de dilución infinita bidimensional en la que las células se diluyeron 1:2 a lo largo de la placa y 1:3 a lo ancho de la placa, comenzando en 5.000 células en el pocillo de la parte superior izquierda. Los clones diluidos se hicieron crecer en un fondo de 500 células CHO DG44 no transfectadas por pocillo, para proporcionar los factores de crecimiento necesarios para los días iniciales en cultivo. Se prepararon diez placas por subclon, conteniendo 5 placas metotrexato 50 nM y 5 placas sin metotrexato.

El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales (13 del tratamiento sin metotrexato y 11 del tratamiento con metotrexato 50 nM). Se midió la actividad de hialuronidasa significativa en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (> 50 unidades/mL), y estos 8 subclones se expandieron en matraces de cultivo de tejidos T-25. Los clones aislados del protocolo de tratamiento con metotrexato se expandieron en presencia de metotrexato 50 nM. El clon 3D35M se expandió adicionalmente en metotrexato 500 nM en matraces oscilantes y dio lugar a clones que producían más de 1.000 Unidades/mL de actividad hialuronidasa (clon 3D35M o Gen1 3D35M). A continuación se preparó un banco celular maestro (BCM) de las células 3D35M

B. Generación de una línea celular de segunda generación que expresa rHuPH20 soluble

La línea celular Gen1 3D35M descrita en el Ejemplo 3A se adaptó a niveles más altos de metotrexato para producir clones de la generación 2 (Gen2). Se sembraron células 3D35M a partir de cultivos establecidos que contenían metotrexato en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 1,0 µM. Las células se adaptaron a un nivel más alto de metotrexato, cultivándolas y pasándolas 9 veces durante un período de 46 días a 37°C, incubadora humidificada CO₂ al 7%. La población amplificada de células se clonó mediante dilución limitante en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían medio con metotrexato 2,0 µM. Después de aproximadamente

4 semanas, se identificaron los clones y se seleccionó el clon 3E10B para la expansión. Se hicieron crecer células 3E10B en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 2,0 µM durante 20 pases. Se creó y congeló un banco de células maestro (BCM) de la línea celular 3E10B y se utilizó para estudios posteriores.

- 5 La amplificación de la línea celular continuó cultivando células 3E10B en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 4,0 µM. Después del 12º pase, las células se congelaron en viales como banco de células de investigación (BCI). Un vial del BCI se descongeló y cultivó en un medio que contenía metotrexato 8,0 µM. Después de 5 días, la concentración de metotrexato en el medio se incrementó a 16,0 µM, a continuación a 20,0 µM
- 10 18 días después. Las células del 8º pase en un medio que contenía metotrexato 20,0 µM se clonaron mediante dilución limitante en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 20,0 µM. Los clones se identificaron 5-6 semanas después y el clon 2B2 se seleccionó para la expansión en medio que contenía metotrexato 20,0 µM. Después del 11º pase, las células 2B2 se congelaron en viales como banco de células de investigación (BCI).
- 15 Las células 2B2 resultantes son células CHO DG44 deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20). La PH20 soluble está presente en células 2B2 con un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis de transferencia Southern de ADN de células 2B2 genómico digerido con Spe I, Xba I y BamH I/Hind III utilizando una sonda específica de rHuPH20 reveló el siguiente perfil de digestión de restricción: una banda de hibridación principal de ~ 7,7 kb y cuatro bandas de hibridación menores (~ 13,9, ~ 6,6, ~ 5,7 y ~ 4,6 kb) con ADN digerido con Spe I; una banda de hibridación principal de ~ 5,0 kb y dos
- 20 bandas de hibridación menores (~13,9 y ~6,5 kb) con ADN digerido con Xba I; y se observó una única banda de hibridación de ~ 1,4 kb utilizando ADN 2B2 digerido con BamH I/Hind III. El análisis de secuencia del transcrito de ARNm indicó que el ADNc derivado (SEQ ID NO: 56) era idéntico a la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 49) excepto por una diferencia de un par de bases en la posición 1131, que se observó que era una timidina (T) en lugar de la citosina esperada (C). Esta es una mutación silenciosa, sin efecto en la secuencia de aminoácidos.
- 25

Ejemplo 4

Producción y purificación de rHuPH20

30

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

- Un vial de células HZ24-2B2 (Ejemplo 3B) se descongeló y se expandió desde matraces oscilantes a través de matraces rotativos de 36 L en medios CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) con un suplemento de metotrexato 20 µM y GlutaMAX-1™ (Invitrogen). Brevemente, se descongeló un vial de células en un baño de agua a 37°C, se
- 35 añadieron medios y las células se centrifugaron. Las células se resuspendieron en un matraz oscilante de 125 mL con 20 mL de medio de nueva aportación y se colocaron en una incubadora a 37°C, 7% de CO₂. Las células se expandieron hasta 40 mL en el matraz oscilante de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz rotativo de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. El matraz se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz rotativo de 250 mL en un volumen de cultivo de 200 mL, y el matraz se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz rotativo de 1 L en un volumen de cultivo de 800 mL y se incubó a 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/mL el cultivo se expandió en un matraz rotativo de 6 L en 5000 mL de volumen de cultivo y se incubó a
- 40 37°C, 7% de CO₂. Cuando la densidad celular alcanzó más de $1,5 \times 10^6$ células/mL, el cultivo se expandió en un matraz rotativo de 36 L en un volumen de cultivo de 32 L y se incubó a 37°C, 7% de CO₂.
- 45

- Un reactor de 400 L se esterilizó y se añadieron 230 mL de medios CD-CHO. Antes de su uso, el reactor se verificó para determinar la contaminación. Se transfirieron aproximadamente 30 L de células desde los matraces rotativos de 36 L al biorreactor de 400 L (Braun) a una densidad de inoculación de $4,0 \times 10^5$ células viables por mL y un volumen total de 260L. Los parámetros fueron el punto de ajuste de la temperatura, 37°C; Velocidad del Impulsor 40-55 RPM; Presión del Recipiente: 0,2 atm; Inyección de Aire 0,5-1,5 L/Min.; Superposición de aire: 3 L/min. El reactor se muestreó diariamente para realizar recuentos de células, verificación de pH, análisis de medios, producción y retención de proteínas. Además, durante el ciclo se agregaron alimentaciones nutrientes. A las 120 h (día 5), se
- 50 añadieron 10,4 L de medio de Alimentación Núm. 1 ($4 \times$ CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 160 mL/L de Glutamax-1™ + 83 mL/L de Yeastolato + 33 mg/L de rHuInsulina). A las 168 horas (día 7), se añadieron 10,8 L de la Alimentación Núm. 2 ($2 \times$ CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 80 mL/L de Glutamax-1™ + 167 mL/L de Yeastolato + 0,92 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 36,5°C. A las 216 horas (día 9), se añadieron 10,8 L de la Alimentación Núm. 3 ($1 \times$ CD-CHO + 50 g/L de Glucosa + 50 mL/L de Glutamax-1™ + 250 mL/L de Yeastolato + 1,80 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 36°C. A las 264 horas (día 11), se añadieron 10,8 L de la Alimentación Núm. 4 ($1 \times$ CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 33 mL/L de Glutamax-1™ + 250 mL/L de Yeastolato + 0,92 g/L de Butirato de Sodio) y la temperatura de cultivo se cambió a 35,5°C. Se observó que la adición de los medios de alimentación aumentaba drásticamente la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de producción. El reactor se cosechó a los 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células cayó por debajo de 40%.
- 60

El procedimiento dio como resultado una productividad final de 17.000 Unidades por mL con una densidad celular máxima de 12 millones de células/mL. En la cosecha, se tomaron muestras del cultivo de micoplasma, carga biológica, endotoxinas y virus *in vitro* e *in vivo*, Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y actividad enzimática.

El cultivo se bombeó mediante una bomba peristáltica a través de cuatro módulos del sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, cada uno con una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada de 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana celulosa, a continuación a través de un segundo sistema de filtración Millistak (Millipore) único que contenía una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas medida a <0,1 µm, seguido de una membrana de celulosa, y a continuación a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa flexible estéril de un solo uso con una capacidad de 350 L. El fluido de cultivo celular cosechado se complementó con EDTA 10 mM y Tris 10 mM a un pH de 7,5. El cultivo se concentró 10 veces con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) utilizando cuatro filtros de poliéter sulfona (PES) de corte de peso molecular (MWCO) de 30 kDa Sartoslice TFF (Sartorius), seguido de un intercambio de tampón 10X con Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 a un filtro final de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 50 L.

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

B. Purificación de rhuPH20 soluble de Gen2

Se preparó una columna de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia) (9 L de resina, H = 29 cm, D = 20 cm). Se tomaron muestras de lavado para la determinación del pH, la conductividad y el análisis de endotoxina (LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5. Después de la inactivación viral, la cosecha concentrada, sometida a diafiltración (Ejemplo 4A) se cargó en la columna Q a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. La proteína se eluyó con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7,0 en un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra de eluato se sometió a ensayo para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad hialuronidasa. Las lecturas de absorbancia a A₂₈₀ se tomaron al comienzo y al final del intercambio.

La cromatografía de interacción hidrófoba en Fenil-Sefarosa (Pharmacia) se realizó a continuación. Se preparó una columna de Fenil-Sefarosa (PS) (19-21 L de resina, H = 29 cm, D = 30 cm). El lavado se recogió y se tomaron muestras para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. El eluato de proteína de la columna de Q sepharose se complementó con soluciones de partida de sulfato de amonio 2 M, fosfato de potasio 1 M y CaCl₂ 1 M para producir concentraciones finales de 5 mM, 0,5 M y 0,1 mM, respectivamente. La proteína se cargó en la columna PS a un caudal de 100 cm/h y se recogió el flujo continuo de la columna. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 mM. pH 7,0 a 100 cm/h y el lavado se añadió al flujo continuo recogido. Combinado con el lavado de la columna, el flujo continuo se pasó a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. El flujo continuo fue muestreado para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Se preparó una columna de aminofenilboronato (ProMedics). El lavado se recogió y se tomaron muestras para determinar el pH, la conductividad y las endotoxinas (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. El flujo continuo de PS que contenía la proteína purificada se cargó en la columna de aminofenilboronato a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7,0. La columna se lavó con bicina 20 mM, sulfato de amonio 0,5 M, pH 9,0. La columna se lavó con bicina 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 9,0. La proteína se eluyó con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6,9 y se pasó a través de un filtro estéril a una bolsa estéril. La muestra eluida se analizó para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad de la enzima.

Se preparó la columna de hidroxiapatita (HAP) (Biorad). El lavado se recolectó y se sometió a ensayo para determinar el pH, la conductividad y la endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. La proteína purificada con aminofenil-boronato se complementó con concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y CaCl₂ 0,1 mM y se cargaron en la columna HAP a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La columna se lavó seguidamente con fosfato de potasio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La proteína se eluyó con fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 y se pasó a través de un filtro estéril de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra eluida se analizó para determinar la carga biológica, la concentración de proteína y la actividad de la enzima.

La proteína purificada en HAP se pasó a continuación a través de un filtro de eliminación de virus. Primero se preparó el filtro Viosart (Sartorius) esterilizado lavando con 2 L de fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0. Antes del uso,

el tampón filtrado se muestreó para determinar el pH y la conductividad. La proteína purificada en HAP se bombeó a través de una bomba peristáltica a través del filtro de eliminación de virus 20 nM. La proteína filtrada en fosfato de potasio 70 mM, pH 7,0 se pasó a través de un filtro final de 0,22 µm a una bolsa estéril. La muestra filtrada para eliminar los virus se sometió a ensayo para determinar el perfil de concentración de proteína, actividad enzimática, oligosacáridos, monosacáridos y ácido siálico. La muestra también se sometió a ensayo para determinar las impurezas relacionadas con el procedimiento.

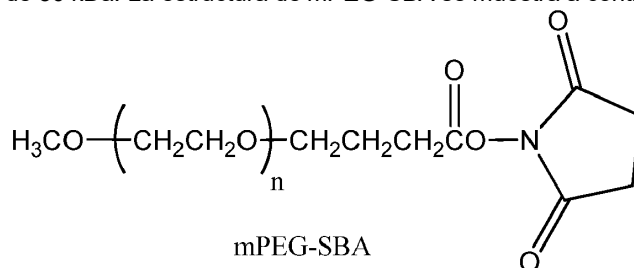
Ejemplo 5

Preparación de rHuPH20 PEGilada

En este ejemplo, la rHuPH20 se PEGiló mediante reacción de la enzima con éster de N-hidroxisuccinimidilo lineal de ácido metoxi-poli(etilenglicol)-butanoico (mPEG-SBA-30K).

A. Preparación de mPEG-SBA-30K

Para generar PEGPH20, se conjugó covalentemente rHuPH20 (que tiene un tamaño de aproximadamente 60 KDa) a un éster N-hidroxisuccinimidílico lineal de ácido metoxi-poli(etilenglicol)-butanoico (mPEG-SBA-30K), que tiene un peso molecular aproximado de 30 kDa. La estructura de mPEG-SBA se muestra a continuación, donde $n \approx 681$.



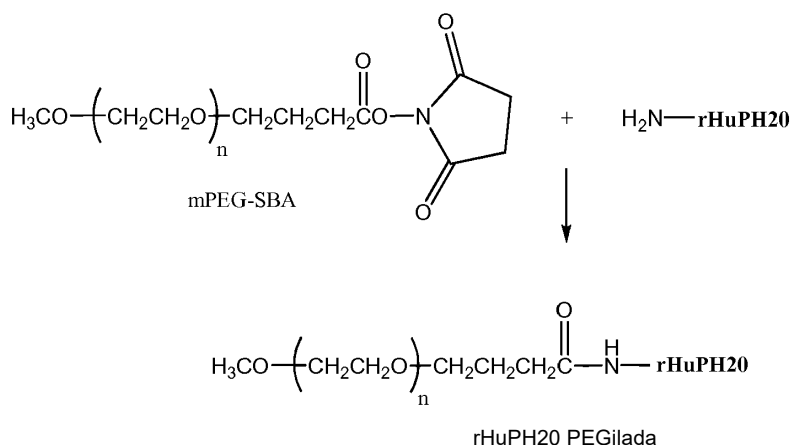
Los métodos utilizados para preparar el mPEG-SBA-30K que se utilizó para PEGilar la rHuPH20 se describen, por ejemplo, en Patente de Estados Unidos Núm. 5.672.662. En resumen, el mPEG-SBA-30K se fabrica de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se añade gota a gota una solución de malonato de etilo (2 equivalentes) disuelto en dioxano a hidruro de sodio (2 equivalentes) y tolueno bajo una atmósfera de nitrógeno. Se disuelve mPEG metano sulfonato (1 equivalente, MW 30 kDa, Shearwater) en tolueno y se añade a la mezcla anterior. La mezcla resultante se deja a reflujo durante aproximadamente 18 horas. La mezcla de reacción se concentra a la mitad de su volumen original, se extrae con una solución acuosa de NaCl al 10%, se extrae con ácido clorhídrico acuoso al 1% y los extractos acuosos se combinan. Las capas acuosas recogidas se extraen con diclorometano (3x) y la capa orgánica se seca con sulfato de magnesio, se filtra y se evapora hasta sequedad. El residuo resultante se disuelve en hidróxido de sodio 1 N que contiene cloruro de sodio y la mezcla se agita durante 1 hora. El pH de la mezcla se ajusta a aproximadamente 3 mediante adición de ácido clorhídrico 6N. La mezcla se extrae con diclorometano (2x).

La capa orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra, se concentra y se vierte en éter dietílico frío. El precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío. El compuesto resultante se disuelve en dioxano y se somete a reflujo durante 8 horas y a continuación se concentra hasta sequedad. El residuo resultante se disuelve en agua y se extrae con diclorometano (2x), se seca sobre sulfato de magnesio y la solución se concentra por evaporación rotativa y a continuación se vierte en éter dietílico frío. El precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío. El compuesto resultante (1 equivalente) se disuelve en diclorometano y se añade N-hidroxisuccinimida (2,1 equivalentes). La solución se enfría a 0°C y se añade gota a gota una solución de dicitlohexilcarbodiimida (2,1 equivalentes) en diclorometano. La solución se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 18 horas. La mezcla de reacción se filtra, concentra y precipita en éter dietílico. El precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío para proporcionar mPEG-SBA-30K en polvo que a continuación se congela a $\leq -15^{\circ}\text{C}$.

B. Conjugación de mPEG-SBA-30K a rHuPH20

Para preparar la PEGPH20, se acopló mPEG-SBA-30K al grupo o los grupos amino de rHuPH20 mediante conjugación covalente, proporcionando enlaces amida estables entre rHuPH20 y mPEG, como se muestra a continuación, donde $n \approx 681$.



Antes de la conjugación, la proteína en masa rHuPH20 purificada preparada en el Ejemplo 4B se concentró a 10 mg/ml, utilizando casetes de filtración de flujo tangencial (TFF) de polietersulfona (PES) de 10 kDa (Sartorius) con un área de filtración de 0,2 m² y se cambió el tampón contra fosfato de potasio 70 mM a pH 7,2. La proteína concentrada se almacenó a continuación a 2-8°C hasta su uso.

Para conjugar la rHuPH20, se descongeló mPEG-SBA-30K (Nektar) a temperatura ambiente en la oscuridad durante no más de 2 horas. Dependiendo del tamaño del lote, se colocó una barra de agitación estéril de 7,62 cm en un matraz Erlenmeyer de 1 o 3 litros y se añadió proteína rHuPH20 con el tampón intercambiado. Se añadieron 5 g de polvo de mPEG-SBA-30K seco por gramo de rHuPH20 (razón molar 10:1 de mPEG-SBA-30K:rHuPH20) al matraz bajo una campana de vacío y la mezcla se mezcló durante 10 minutos o hasta que se disolvió por completo el mPEG-SBA-30K. La velocidad de agitación se ajustó de manera que se produjera agitación vorticial sin formación de espuma.

La solución se filtró a continuación bajo una campana de clase 100 bombeando la solución, a través de una bomba peristáltica, a través de una cápsula de filtro de acetato de celulosa con poliestireno de 0,22 µm (filtro Tubetop Corning de 50 mL) a un nuevo matraz Erlenmeyer de 1 o 3 litros que contenía una barra de agitación de 7,62 cm estéril. El volumen de la mezcla de reacción de PEGPH20 se determinó en masa (densidad de 1 g/ml) y el filtro de 0,22 µm utilizado para la filtración se examinó en una prueba de integridad posterior al uso.

La mezcla se colocó a continuación en una placa de agitación a 2-8°C y se mezcló durante 20 ± 1 horas en la oscuridad. La velocidad de agitación se ajustó de nuevo de manera que se produjera agitación vorticial sin formación de espuma. Todo el recipiente Erlenmeyer se envolvió en papel de aluminio para proteger la solución de la luz. Después de mezclar, la reacción se inactivó mediante la adición de glicina 1 M a una concentración final 25 mM. Las muestras se retiraron del recipiente para someter a ensayo el pH y la conductividad. Después, se ajustaron el pH y la conductividad mediante la adición a una solución de Tris Base 5 mM (5,65 L/L) y Tris 5 mM, NaCl 10 mM, pH 8,0 (13,35 L/L) para proceder a la purificación con Q Sepharose.

Se preparó una columna de intercambio iónico QFF Sepharose (GE Healthcare) (Altura = 21,5-24,0 cm, Diámetro = 20 cm) equilibrando con 5 volúmenes de columna (36 L) de Tris 5 mM, NaCl 10 mM, pH 8,0. El producto conjugado se cargó en la columna QFF a un caudal de 95 cm/h. La columna se lavó a continuación con 11 L de tampón de equilibrado (Tris 5 mM, NaCl 10 mM, pH 8,0) a un caudal de 95 cm/h seguido de un lavado con 25 L de tampón de equilibrado a un caudal de 268 cm/hora. El producto proteico se eluyó a continuación con Tris 5 mM, NaCl 130 mM, pH 8,0 a un caudal de 268 cm/h. La PEGPH20 purificada resultante se concentró a 3,5 mg/ml, utilizando un casete de filtración de flujo tangencial (TFF) de polietersulfona (PES) de 30 kDa (Sartorius) con un área de filtración de 0,2 m², y el tampón se cambió contra Histidina 10 mM, NaCl 130 mM a pH 6,5. El material resultante se sometió a ensayo para determinar la actividad enzimática como se describe en el Ejemplo 6 a continuación. Se cargó el material rHuPH20 PEGilado a una concentración de 3,5 mg/mL (actividad enzimática final 140.000 U/ml), en volúmenes de 3 mL, en viales de vidrio de 5 mL con un tapón de caucho de bromobutilo siliconado y precinto de aluminio desprendible, y se congelaron (congelar durante la noche en un congelador a -80°C, a continuación colocar en un congelador a -20°C para un almacenamiento más prolongado). La rHuHP20 PEGilada contenía aproximadamente 4,5 moles de PEG por mol de rHuPH20.

Ejemplo 6

Determinación de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble

La actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble en muestras tales como cultivos celulares, plasma, fracciones de

purificación y soluciones purificadas se determinó utilizando un ensayo turbidimétrico, que se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une a albúmina sérica, o un ensayo con sustrato de ácido hialurónico biotinilado, que mide la cantidad de rHuPH20 o PEGPH20 enzimáticamente activa mediante la digestión del sustrato de ácido hialurónico biotinilado (b-HA) unido no covalentemente a placas de microtitulación de múltiples pocillos de plástico.

A. Ensayo de microturbidez

La actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble se mide incubando rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un período de tiempo determinado (10 minutos) y a continuación precipitando el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina de suero acidulada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un período de desarrollo de 30 minutos. La disminución de la turbidez resultante de la actividad enzimática en el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble. El método se realiza utilizando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de trabajo para ensayo con rHuPH20 soluble, y las mediciones de la actividad de la muestra se realizan con respecto a esta curva de calibración.

Las diluciones de la muestra se prepararon en Soluciones de Diluyente Enzimático. La Solución de Diluyente Enzimático se preparó disolviendo $33,0 \pm 0,05$ mg de gelatina hidrolizada en 25,0 mL del tampón de reacción PIPES 50 mM (NaCl 140 mM, PIPES 50 mM, pH 5,5) y 25,0 mL de agua estéril para inyectables (SWFI), y diluyendo 0,2 mL de solución de Buminat al 25% en la mezcla y sometiendo a agitación vorticial durante 30 segundos. Esto se realizó en el plazo de las 2 horas posteriores al uso y se almacenó en hielo hasta que fue necesario. Las muestras se diluyeron a 1-2 U/mL estimadas. Generalmente, la dilución máxima por etapa no excedió de 1:100 y el tamaño de muestra inicial para la primera dilución no fue inferior a 20 μ L. Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para realizar el ensayo fueron los siguientes: Muestras En Proceso, Fracciones de FPLC: 80 μ L; Sobrenadantes de Cultivo Tisular: 1 mL; Material Concentrado: 80 μ L; Material de la Etapa Purificado o Final: 80 μ L. Las diluciones se realizaron por triplicado en una placa de 96 pocillos de Baja Unión de Proteína, y 30 μ L de cada dilución se transfirieron a placas de fondo negro/transparente Optilux (BD BioSciences).

Se prepararon diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2,5 U/mL en Solución de Diluyente Enzimático para generar una curva patrón y se añadieron a la placa Optilux por triplicado. Las diluciones incluyeron 0 U/mL, 0,25 U/mL, 0,5 U/mL, 1,0 U/mL, 1,5 U/mL, 2,0 U/mL y 2,5 U/mL. Los pocillos de "Blanco reactivo" que contenían 60 μ L de solución de Diluyente Enzimático se incluyeron en la placa como control negativo. La placa se cubrió a continuación y se calentó en un bloque térmico durante 5 minutos a 37°C. La cubierta se retiró y la placa se sacudió durante 10 segundos. Después de sacudir, la placa se devolvió al bloque térmico y se cebó el Dispositivo de Manejo de Líquidos MULTIDROP 384 con la solución de hialuronato de sodio caliente de 0,25 mg/mL (preparada disolviendo 100 mg de hialuronato de sodio (LifeCore Biomedical) en 20,0 mL de SWFI. Esto se mezcló girando suavemente y/o balanceando a 2-8°C durante 2-4 horas, o hasta que se disolvió completamente). La placa de reacción se transfirió a MULTIDROP 384 y la reacción se inició presionando la tecla de inicio para dispensar 30 μ L de hialuronato sódico a cada pocillo. A continuación la placa se retiró del MULTIDROP 384 y se sacudió durante 10 segundos antes de ser transferida a un bloque térmico con la cubierta de la placa reemplazada. La placa se incubó a 37°C durante 10 minutos.

El MULTIDROP 384 se preparó para detener la reacción cebando la máquina con Solución de Trabajo de Suero y cambiando la configuración de volumen a 240 μ L (25 mL de Solución de Partida de Suero [1 volumen de suero de caballo (Sigma) se diluyó con 9 volúmenes de Solución Tampón de Acetato 500 mM] y el pH se ajustó a 3,1 con ácido clorhídrico] en 75 mL de Solución Tampón de Acetato 500 mM). La placa se retiró del bloque térmico y se colocó en el MULTIDROP 384, y se dispensaron 240 μ L de Soluciones de Trabajo en suero a los pocillos. La placa se retiró y se sacudió en un lector de placas durante 10 segundos. Después de otros 15 minutos, se midió la turbidez de las muestras a 640 nm y se determinó la actividad hialuronidasa (en U/ml) de cada muestra mediante el ajuste a la curva patrón.

La actividad específica (unidades/mg) se calculó dividiendo la actividad de hialuronidasa (U/ml) por la concentración de proteína (mg/ml).

B. Ensayo de hialuronano biotinilado

El ensayo de ácido hialurónico biotinilado mide la cantidad de rHuPH20 o PEGPH20 enzimáticamente activas en muestras biológicas mediante la digestión de un sustrato de ácido hialurónico biotinilado (b-HA) de gran peso molecular (~ 1,2 megadaltons) unido no covalentemente a placas de microtitulación de múltiples pocillos de plástico. Se deja que la rHuPH20 o PEGPH20 de los patrones y las muestras se incuben en una placa recubierta con b-HA a 37°C. Después de una serie de lavados, la b-HA no escindida/unida se trata con producto conjugado de estreptavidina - peroxidasa de rábano picante (SA-HRP). La reacción entre SA-HRP inmovilizada y el sustrato cromogénico, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), produce una solución de color azul. Después de detener la

reacción con ácido, se determina la formación del producto de reacción amarillo soluble leyendo la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placa de microtitulación. La disminución de la absorbancia a 450 nm que resulta de la actividad enzimática en el sustrato de ácido hialurónico biotinilado (b-HA) es una medida de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble. El método se realiza utilizando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de rHuPH20 o PEGPH20 soluble, y las mediciones de la actividad de la muestra se realizan con respecto a esta curva de calibración.

Las diluciones de la muestra y el calibrador se prepararon en Diluyente de Ensayo. El diluyente de ensayo se preparó añadiendo plasma reunido al 1% v/v (de la especie apropiada) a BSA en HEPES al 0,1% (p/v), pH 7,4. Esto se preparó diariamente y se almacenó a 2-8°C. Dependiendo del tipo de especie y del nivel de hialuronidasa previsto, se prepararon diluciones únicas o múltiples para asegurar que al menos una dilución de muestra cayera dentro del intervalo de la curva de calibración. Para guiar la selección de las diluciones de la muestra de ensayo, se utilizaron la información conocida sobre la dosis de hialuronidasa administrada, la vía de administración, el volumen plasmático aproximado de la especie y el punto temporal para estimar los niveles de actividad hialuronidasa. Cada dilución de muestra se mezcló a medida que se preparaba mediante agitación vorticial de pulso breve y las puntas de pipeta se cambiaron entre cada dilución. En general, las diluciones comenzaron con una dilución inicial de 50 o 100 veces seguida de diluciones seriadas adicionales. Se preparó una curva de calibración de siete puntos de rHuPH20 o PEGPH20 (dependiendo del tratamiento administrado) que variaba de una concentración de 0,004 a 3,0 U/mL para rHuPH20 y de 0,037 a 27 U/mL para PEGPH20. Se aplicaron cien microlitros (100 µL) de cada dilución de muestra de ensayo y un punto de curva de calibración a pocillos por triplicado de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Immulon 4HBX, Thermo) que se había recubierto previamente con 100 µL por pocillo de b-HA a 0,1 mg/mL y bloqueado con 250 µL de albúmina de suero bovino al 1,0% (p/v) en PBS. Las placas se cubrieron con un sello de placa adhesiva y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 90 minutos. Al final del período de incubación, el sello adhesivo se retiró de la placa, las muestras se aspiraron y la placa se lavó cinco (5) veces con 300 µL por pocillo Tampón de Lavado (Tampón de Fosfato 10 mM, Cloruro de Potasio 2,7 mM, Cloruro Sodio 137 mM, pH 7,4, con Tween 20 al 0,05% (v/v), PBST) utilizando un lavador de placas automatizado (BioTek ELx405 Select CW, Programa '4HBX1'). Se añadieron 100 microlitros de Solución de Trabajo de Producto Conjugado de Estreptavidina-HRP [producto conjugado de estreptavidina-HRP (1:5.000 v/v) en Tris-HCl 20 mM, Cloruro de Sodio 137 mM, 0,025% (v/v) Tween 20, Albúmina de Suero Bovino al 0,1% (p/v) por pocillo. La placa se selló y se dejó incubando a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos sin sacudimiento y protegida de la luz. Al final del período de incubación, el sello adhesivo se retiró de la placa, las muestras se aspiraron y la placa se lavó cinco (5) veces con 300 µL por pocillo de Tampón de Lavado como se describió anteriormente. Se añadió solución de TMB (a temperatura ambiente) a cada pocillo y se dejó incubando protegida de la luz durante aproximadamente cinco (5) minutos a temperatura ambiente. La Solución de Parada de TMB (KPL, Núm. de Catálogo 50-85-06) se añadió a continuación a 100 µL por pocillo. La absorbancia de cada pocillo a 450 nm se determinó utilizando un espectrofotómetro de placa de microtitulación. La respuesta de la Curva de Calibración de cada placa se modeló utilizando un ajuste de curva logística de 4 parámetros. La actividad hialuronidasa de cada incógnita se calculó mediante la interpolación de la curva de calibración, se corrigió el factor de dilución de la muestra y se refirió en U/ml.

Ejemplo 7

Efecto del tratamiento con PEGPH20 en un modelo tumoral con hialuronano (AH) peritumoral alto

Para evaluar el efecto de PEGPH20 sobre niveles elevados de HA peritumoral, se generó una línea celular tumoral BxPC3-Has3 para establecer un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón HA^{alto}. Las células BxPC3 (ATCC Núm de Cat. CRL-1687) se cultivaron en condiciones de cultivo convencionales utilizando medios RPMI completos. Se generó un sistema lentiviral para expresar el transcrito de ADNc de hialuronano sintasa 3 humana (expuesto en SEQ ID NO: 212). El vector lentiviral generado que expresaba el ADNc de hHAS3 se denominó pLV-EF1a-hHAS3-IRES-Hyg y se expone en SEQ ID NO: 213. La línea celular estable BX-PC3-Has3 se generó por infección viral con pLV-EF1a-hHAS3-IRES-Hyg, seguido de la selección con higromicina. Las células infectadas para expresar en exceso hHAS3 se utilizaron en todos los experimentos.

Para confirmar los niveles de HA, se midió la intensidad del color en la sección del tumor con el programa de espectro de Aperio. El tumor fue calificado como HA^{Alto} a fuerte tinción de HA sobre 25% de la sección del tumor; como HA^{Moderado} a fuerte tinción de HA entre el 10 y 25% de la sección del tumor; como HA^{Bajo} a fuerte tinción de HA por debajo de 10% de la sección del tumor.

A los ratones NCr (nu/nu) que tenían de 5 a 6 semanas de edad y pesaban entre 20 y 25 g se les inocularon células BxPC-3-Has3 (5 x 10⁶/50 µL) adyacente al periostio tibial derecho, generando tumores de alta presión. La longitud (L) y el ancho (W) de la masa tumoral sólida se midieron mediante calibre y el volumen del tumor (VT) se calculó como: (L x W²)/2. Cuando el volumen de tumores alcanzó aproximadamente 1.500 a 2.000 mm³ de diámetro, los ratones se estaficaron en dos grupos de tratamiento: (1) BxPC3 HA^{alto}, control de vehículo o (2) BxPC3 HA^{alto}, PEGPH20.

A los animales se les administró vehículo (Histidina 10 mM, pH 6,5, NaCl 130 mM) o PEGPH20 (4,5 mg/kg) a las 0 horas y nuevamente a las 42 horas. Con el primer tratamiento de PEGPH20 o control de vehículo (48 horas antes del sacrificio, es decir, a $t = 0$ horas), los animales también se trataron con 240 mg/kg de gemcitabina, intraperitonealmente, y 10 mg/kg de paclitaxel (Abraxane®), por vía intravenosa. Dos horas antes del sacrificio (46 horas), los animales se trataron por vía intraperitoneal con HYPOXYPROBE™ (hidrocloruro de pimonidazol, Chemicon International, Temecula, CA) a 60 mg/kg y también con 0,5 mL de BrdU. Cinco minutos antes del sacrificio (48 horas), los animales se trataron por vía intravenosa con 75 μ L de carbocianina fluorescente de 0,6 mg/mL disuelta en DMSO 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato (Dil).

Los animales fueron sacrificados a las 48 horas. Los tumores completos se recogieron, los tejidos se enfriaron a -20°C en bloques de aluminio, se cubrieron en un medio OCT incluyente (Sakura Finetek, Torrance, CA) y se almacenaron a -80°C hasta el corte. Las criosecciones tumorales se cortaron en secciones de 10 μm y se procesaron para la inmunohistoquímica o se obtuvieron imágenes microscópicas. Se evaluaron los efectos sobre la perfusión vascular y la hipoxia tumoral.

A. Perfusión vascular

Las criosecciones frescas no teñidas se escanearon con un sistema de obtención de imágenes de microscopía de fluorescencia (BD CARV II Confocal Imager, Sparks, MD; cámara Quentem 512sc (Photometrics, Tucson, AZ); fase x-y motorizada MIV2000, y MetaMorph System, Sunnyvale, CA). Las secciones tumorales enteras se escanearon a 10x para determinar la señal de carbocianina fluorescente (Dil) (Excitación a 562 nm/emisión a 624 nm) para determinar la perfusión tumoral. Las imágenes se analizaron utilizando un Image-Pro Analyzer 7.0 (Media Cybermetrics, Bethesda, MD). Se determinaron el área tumoral completa y el área de tinción positiva. La perfusión vascular en cada tumor se calculó como porcentaje (señal) positivo en toda la sección del tumor.

Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los resultados muestran que el tratamiento con PEG-PH20 mediaba la perfusión de colorante en tumores BxPC3-HAS3, con un aumento significativo en la perfusión de vasos sanguíneos en tumores de ratones tratados con PEGPH20 frente a tumores tratados con control. Como se resume en la Tabla 8, los animales tratados con PEGPH20 mostraron un aumento de la perfusión vascular con un área promedio de $7,24 \pm 1,78$, que es un aumento de 116,9% sobre los animales de control.

Tabla 8: Aumento mediado por PEGPH20 en la perfusión vascular en tumores con HA^{alto}

	% Promedio del área vascular en la sección completa del tumor	P	% incremento
control (n = 7)	$3,42 \pm 0,53$	-	-
PEGPH20 (n = 6)	$7,24 \pm 1,78$	<0,0001	116,9

B. Hipoxia

Las secciones tumorales de los animales tratados se compararon para determinar las regiones hipóxicas mediante la visualización de hidrocloruro de pimonidazol (HYPOXYPROBE™). Específicamente, después del sacrificio, se sondearon criosecciones que se habían bloqueado con suero de cabra para su tinción inespecífica durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:50 de anticuerpo anti-pimonidazol (Hypoxyprobe™-1 Mab-1, IgG de ratón₁; Chemicon International, Temecula, CA) para detectar aductos de pimonidazol o con un anticuerpo anti-CD31 de dilución 1:100 (rata, BD Pharmingen, San Diego, CA) para detectar células endoteliales. Después del lavado para eliminar el reactivo primario, se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra con FITC (para visualizar Hypoxyprobe™-1 Mab-1, dilución 1: 100; Vector Labs Burlingame, CA, EE. UU.) o un anticuerpo secundario anti-rata de cabra con Rojo Texas (para visualizar las células endoteliales CD31; dilución 1:100; Vector Labs Burlingame, CA EE.UU.) como reactivo secundario durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron imágenes de las secciones utilizando el sistema de obtención de imágenes Image-Pro Analyzer 7.0 (Media Cybermetrics, Bethesda, MD). Para la formación de imágenes de CD31, la longitud de onda de excitación fue de 562 nm y la longitud de onda de emisión fue de 624 nm. Para obtener imágenes para el hidrocloruro de pimonidazol (HYPOXYPROBE™), la longitud de onda de excitación fue de 490 nm y la longitud de onda de emisión fue de 520 nm.

Los resultados se muestran en la Tabla 9. Los resultados mostraron que PEGPH20, que media la eliminación de HA, da como resultado una reducción de la hipoxia en los tumores BxPC3-Has3. Los animales de control tenían un porcentaje medio de área hipóxica en la sección tumoral completa de $3,98 \pm 2,70\%$. Los animales tratados con PEGPH20 tenían una reducción del área de hipoxia en los tumores con un área media de $0,86 \pm 1,07$, que es una disminución de 78% con respecto a los animales control.

Tabla 9: Disminución mediada por PEGPH20 en áreas hipóxicas en tumores con HA ^{alto}			
	% del área de hipoxia en la sección completa del tumor	P	% de disminución
control (n = 7)	3,98 ± 2,70	-	-
PEGPH20 (n = 6)	0,86 ± 1,07	0,035	78

Ejemplo 8

Efecto del tratamiento combinatorio con PEGPH20 y nab-paclitaxel en un modelo de tumor de cáncer de mama triple negativo con hialuronano (HA) peritumoral alto

La línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-468 (TNBC) se generó para expresar en exceso el transcrito de ADNc de hHAS3A (SEC ID NO: 212) y establecer así un Modelo de TNBC de HA^{alto}. Las células MDA-MB-468 (ATCC Núm. de Cat.HTB-132), cultivadas en condiciones de cultivo convencionales utilizando medio RPMI completo, se infectaron con el vector lentiviral que expresaba ADNc de hHAS3 pLV-EF1a-hHAS3-IRES-Hyg (SEQ ID NO: 213), descrito anteriormente, seguido de selección con higromicina para generar la línea celular estable que expresa hHAS3 MDA-MB-468/HAS3.

Las células MDA-MB-468/HAS3, suspendidas en RPMI, se inyectaron en ratones carentes de sistema inmunitario. El volumen tumoral se midió como se describió anteriormente. El día 17, cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 300 mm³, los animales se dividieron en 6 grupos de tratamiento, a los que se les administró 1) vehículo; 2) 1 mg/kg de Nab-paclitaxel; 3) 3 mg/kg de nab-paclitaxel; 4) 10 mg/kg de nab-paclitaxel; 5) 4,5 mg/kg de PEGPH20; o 6) 1 mg/kg de Nab-paclitaxel y 4,5 mg/kg de PEG20 por vía intravenosa. Los volúmenes tumorales se midieron cada 3 a 4 días durante 45 días.

Los resultados se muestran en la Figura 6. Los animales del grupo de tratamiento 1, que reciben solo vehículo, exhibieron un crecimiento tumoral progresivo a lo largo del curso del estudio. El último día del estudio (día 62), el tamaño promedio del tumor había duplicado el volumen. Los tumores de animales en los grupos de tratamiento 2 y 3 que recibieron nab-paclitaxel a 1 o 3 mg/kg exhibieron una disminución inicial (aproximadamente 30%) del volumen tumoral en los días 17-27 después de la implantación celular (0-10 días después del tratamiento), pero a continuación el crecimiento tumoral se reanudó a un ritmo reducido en comparación con los animales de control de vehículo. El último día del estudio, el volumen tumoral promedio fue casi el doble del volumen inicial.

El patrón de crecimiento tumoral observado para los animales tratados con PEGPH20 (grupo 5) fue similar al de los grupos 2 y 3, pero el tamaño promedio del tumor para el grupo 5 fue ligeramente menor que el de los grupos 2 y 3 el último día. El tamaño tumoral promedio de los animales del grupo 4, que recibió 10 mg/kg de nab-paclitaxel, siguió la misma tendencia que los grupos 2, 3 y 5 durante los primeros 10 días después del tratamiento (días de estudio 17-27), pero a continuación se mantuvo en el volumen reducido durante 11 días adicionales y a continuación disminuyó progresivamente durante el resto del estudio 30% adicional para producir un volumen tumoral promedio al final del estudio que fue un tercio del volumen tumoral inicial promedio.

La combinación de 1 mg/kg de nab-paclitaxel y PEGPH20 (grupo 6) dio como resultado una disminución sustancial del volumen tumoral promedio. Estos resultados muestran que hay efectos sinérgicos sobre el tratamiento con la combinación de nab-paclitaxel y PEGPH20, que da como resultado una eficacia significativamente mejorada en la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con los tratamientos individuales a la misma dosis. La terapia combinada dio como resultado una disminución similar del volumen tumoral a la observada para animales que recibieron 10 veces más nab-paclitaxel como terapia única (10 mg/kg nab-paclitaxel (grupo 5)), que también produjo un volumen tumoral promedio final que fue aproximadamente un tercio del volumen tumoral inicial promedio.

Dado que las modificaciones serán evidentes para los expertos en la técnica, se pretende que esta invención esté limitada únicamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Halozyme, Inc.
 Maneval, Daniel C.
 Shepard, Harold Michael
 Thompson, Curtis B.

10 <120> Terapia combinada con un Agente Anti-Hialuronano y un Agente Terapéutico

10 <130> 033320.03108.WO01/3108PC

15 <140> No designado aún
 <141> Adjunto

15 <150> US 61/686,429
 <151> 04-04-2012

20 <150> US 61/714,719
 <151> 19-10-2012

20 <160> 213

25 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

25 <210> 1
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <223> PH20 precursora humana

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

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

<210> 2
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 madura

<400> 2
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 35 40 45
 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
 85 90 95
 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
 100 105 110
 Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
 115 120 125

ES 2 673 093 T3

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

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

<220>
 <223> PH20 precursor 1-482

<400> 3
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60

```

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

```

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

<220>
 <223> PH20 36-482

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-481

<400> 5

```

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

```

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

<220>
 <223> PH20 36-480

<400> 6

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

5 <210> 7
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> PH20 36-479
 <400> 7

```

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

```

5 <210> 8
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> PH20 36-478
 <400> 8

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

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

<220>
 <223> PH20 36-477

<400> 9

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

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

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 10

```

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

```

<210> 11

<211> 553

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> PH20 precursor de vaca

<400> 11

Met	Arg	Met	Leu	Arg	Arg	His	His	Ile	Ser	Phe	Arg	Ser	Phe	Ala	Gly
1			5					10					15		
Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Gln	Ala	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Pro	Cys
		20						25				30			
Cys	Leu	Ala	Leu	Asp	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Leu	Ile	Ser	Asn	Thr	Ser
	35						40					45			
Phe	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Val	Glu	Arg	Cys	Val	Asn	Arg	Arg
	50					55					60				
Phe	Gln	Leu	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg	Leu	Phe	Ser	Val	Lys	Gly	Ser	Pro
65					70					75					80
Gln	Lys	Ser	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	Ile	Thr	Leu	Phe	Tyr	Ala	Asp	Arg
				85					90					95	
Leu	Gly	Tyr	Tyr	Pro	His	Ile	Asp	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Thr	Val	Phe
			100					105					110		
Gly	Gly	Ile	Pro	Gln	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Ser	His	Met	Glu	Lys	Ala
		115					120					125			
Lys	Asn	Asp	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Pro	Asn	Asp	Ser	Val	Gly	Leu	Ala
	130						135				140				
Val	Ile	Asp	Trp	Glu	Asn	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys
145					150					155					160
Pro	Lys	Asp	Val	Tyr	Arg	Asp	Glu	Ser	Val	Glu	Leu	Val	Leu	Gln	Lys
				165					170					175	
Asn	Pro	Gln	Leu	Ser	Phe	Pro	Glu	Ala	Ser	Lys	Ile	Ala	Lys	Val	Asp
			180					185					190		
Phe	Glu	Thr	Ala	Gly	Lys	Ser	Phe	Met	Gln	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Gly
		195					200					205			
Lys	Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp
	210					215					220				
Cys	Tyr	Asn	His	Asn	His	Asn	Gln	Pro	Thr	Tyr	Asn	Gly	Asn	Cys	Pro
225					230					235					240
Asp	Val	Glu	Lys	Arg	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Glu	Trp	Leu	Trp	Lys	Glu
				245					250					255	
Ser	Thr	Ala	Leu	Phe	Pro	Ser	Val	Tyr	Leu	Asn	Ile	Arg	Leu	Lys	Ser
			260					265					270		
Thr	Gln	Asn	Ala	Ala	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Gln	Glu	Ala	Ile
		275					280					285			
Arg	Leu	Ser	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Val
	290					295					300				
Tyr	Ala	Arg	Pro	Val	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Gln
305					310				315						320
Gly	Asp	Leu	Val	Asn	Ser	Val	Gly	Glu	Ile	Val	Ser	Leu	Gly	Ala	Ser
				325					330					335	
Gly	Ile	Ile	Met	Trp	Gly	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	Met	Gln	Ser
			340					345					350		
Cys	Met	Asn	Leu	Gly	Thr	Tyr	Leu	Asn	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile
		355						360				365			
Ile	Asn	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	His
	370					375					380				
Asn	Glu	Gly	Val	Cys	Thr	Arg	Lys	His	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu
385					390					395					400
His	Leu	Asn	Pro	Met	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Thr	Gly	Glu	Gly	Gly	Lys
				405					410					415	
Tyr	Thr	Val	Pro	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Gln	Lys	Phe	Ser
			420					425					430		
Asp	Thr	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ala	Asn	Ile	His	Cys	Lys	Lys	Arg
		435					440					445			
Val	Asp	Ile	Lys	Asn	Val	His	Ser	Val	Asn	Val	Cys	Met	Ala	Glu	Asp
	450					455					460				
Ile	Cys	Ile	Asp	Ser	Pro	Val	Lys	Leu	Gln	Pro	Ser	Asp	His	Ser	Ser
465					470					475					480
Ser	Gln	Glu	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Phe	Ser	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Thr
				485					490					495	
Thr	Thr	Ala	Thr	Val	Ser	Pro	Cys	Thr	Pro	Glu	Lys	His	Ser	Pro	Glu
		500						505					510		
Cys	Leu	Lys	Val	Arg	Cys	Ser	Glu	Val	Ile	Pro	Asn	Val	Thr	Gln	Lys
		515					520					525			
Ala	Cys	Gln	Ser	Val	Lys	Leu	Lys	Asn	Ile	Ser	Tyr	Gln	Ser	Pro	Ile
	530					535					540				
Gln	Asn	Ile	Lys	Asn	Gln	Thr	Thr	Tyr							
545					550										

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

5

<220>
 <223> Hialuronidasa A

<400> 12
 Ser Glu Arg Pro Lys Arg Val Phe Asn Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Met Cys His Gln Tyr Asp Leu Tyr Phe Asp Glu Val Thr Asn Phe
 20 25 30
 Asn Ile Lys Arg Asn Ser Lys Asp Asp Phe Gln Gly Asp Lys Ile Ala
 35 40 45
 Ile Phe Tyr Asp Pro Gly Glu Phe Pro Ala Leu Leu Ser Leu Lys Asp
 50 55 60
 Gly Lys Tyr Lys Lys Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Ile
 65 70 75 80
 Thr Ile His Leu Gln Lys Phe Ile Glu Asn Leu Asp Lys Ile Tyr Pro
 85 90 95
 Asn Arg Asn Phe Ser Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Arg
 100 105 110
 Pro Ile Phe Arg Gln Asn Trp Gly Asn Met Lys Ile His Lys Asn Phe
 115 120 125
 Ser Ile Asp Leu Val Arg Asn Glu His Pro Thr Trp Asn Lys Lys Met
 130 135 140
 Ile Glu Leu Glu Ala Ser Lys Arg Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Phe Phe
 145 150 155 160
 Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Ala Lys Lys Thr Arg Lys Gln Ala Asp
 165 170 175
 Trp Gly Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Cys Phe Asn Met Ser Pro Asn Asn
 180 185 190
 Leu Val Pro Glu Cys Asp Val Thr Ala Met His Glu Asn Asp Lys Met
 195 200 205
 Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Val Tyr Val
 210 215 220
 Arg Gln Glu Leu Thr Pro Asp Gln Arg Ile Gly Leu Val Gln Gly Arg
 225 230 235 240
 Val Lys Glu Ala Val Arg Ile Ser Asn Asn Leu Lys His Ser Pro Lys
 245 250 255
 Val Leu Ser Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Glu Thr Asn Thr Phe
 260 265 270
 Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Val Ile Asn
 275 280 285
 Gly Gly Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser
 290 295 300
 Leu Ser Lys Cys Lys Arg Leu Gln Asp Tyr Leu Leu Thr Val Leu Gly
 305 310 315 320
 Pro Ile Ala Ile Asn Val Thr Glu Ala Val Asn
 325 330

10

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

15

<220>
 <223> Hialuronidasa B

20

<400> 13

ES 2 673 093 T3

```

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

```

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

<220>
 <223> Hialuronidasa

<400> 14

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

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

<220>
 <223> Hialuronidasa

<400> 15

Ser Glu Arg Pro Lys Arg Val Phe Asn Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr
1 5 10 15
Phe Met Cys His Gln Tyr Gly Leu Tyr Phe Asp Glu Val Thr Asn Phe
20 25 30
Asn Ile Lys His Asn Ser Lys Asp Asp Phe Gln Gly Asp Lys Ile Ser
35 40 45
Ile Phe Tyr Asp Pro Gly Glu Phe Pro Ala Leu Leu Pro Leu Lys Glu
50 55 60
Gly Asn Tyr Lys Ile Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Ile
65 70 75 80
Thr Ile His Leu Gln Arg Phe Ile Glu Asn Leu Asp Lys Thr Tyr Pro
85 90 95
Asn Arg Asn Phe Asn Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Arg
100 105 110
Pro Ile Phe Arg Gln Asn Trp Gly Asn Met Met Ile His Lys Lys Phe
115 120 125
Ser Ile Asp Leu Val Arg Asn Glu His Pro Phe Trp Asp Lys Lys Met
130 135 140
Ile Glu Leu Glu Ala Ser Lys Arg Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Leu Phe
145 150 155 160
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> 16
<211> 367
<212> PRT
<213> Polistes annularis

<220>
<223> Hialuronidasa

<400> 16

ES 2 673 093 T3

```

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

```

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

<220>
 <223> Hialuronidasa

<400> 17

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

<210> 18

<211> 473

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Hialuronidasa 2

<400> 18

```

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

```

<210> 19
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> Hialuronidasa 3

```

<400> 19
Met Ile Met His Leu Gly Leu Met Met Val Val Gly Leu Thr Leu Cys
 1          5          10          15
Leu Met His Gly Gln Ala Leu Leu Gln Val Pro Glu His Pro Phe Ser
 20          25          30
Val Val Trp Asn Val Pro Ser Ala Arg Cys Lys Ala His Phe Gly Val
 35          40          45
His Leu Pro Leu Asp Ala Leu Gly Ile Val Ala Asn His Gly Gln His
 50          55          60
Phe His Gly Gln Asn Ile Ser Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Phe Gly Leu
 65          70          75          80
Tyr Pro Tyr Phe Gly Pro Arg Gly Thr Ala His Asn Gly Gly Ile Pro
 85          90          95
Gln Ala Val Ser Leu Asp His His Leu Ala Arg Ala Ala His Gln Ile
 100         105         110
Leu His Ser Leu Gly Ser Ser Phe Ala Gly Leu Ala Val Leu Asp Trp
 115         120         125
Glu Glu Trp Tyr Pro Leu Trp Ala Gly Asn Trp Gly Pro His Arg Gln
 130         135         140
Val Tyr Leu Ala Ala Ser Trp Val Trp Thr Gln Gln Met Phe Pro Gly
 145         150         155         160
Leu Asp Pro Gln Glu Gln Leu His Lys Ala His Thr Ser Phe Glu Gln
 165         170         175
Ala Ala Arg Ala Leu Met Glu Tyr Thr Leu Gln Leu Gly Arg Thr Leu
 180         185         190
Arg Pro Ser Gly Leu Trp Gly Phe Tyr Arg Tyr Pro Ala Cys Gly Asn
 195         200         205
Gly Trp His Lys Met Ala Ser Asn Tyr Thr Gly His Cys His Ala Ala
 210         215         220
Ile Thr Thr Gln Asn Thr Gln Leu Arg Trp Leu Trp Ala Ala Ser Ser
 225         230         235         240
Ala Leu Phe Pro Ser Ile Tyr Leu Pro Pro Arg Leu Pro Leu Ala Tyr
 245         250         255
Arg Gln Ala Phe Val Arg His Arg Leu Glu Glu Ala Phe Arg Val Ala
 260         265         270
Leu Leu Glu His Ser His Pro Leu Pro Val Leu Ala Tyr Ser Arg Leu
 275         280         285
Thr His Arg Ser Ser Gly Arg Phe Leu Ser Leu Asp Asp Leu Met Gln
 290         295         300
Thr Ile Gly Val Ser Ala Ala Leu Gly Thr Ala Gly Val Val Leu Trp
 305         310         315         320
Gly Asp Leu Ser Phe Ser Ser Ser Glu Glu Lys Cys Trp Arg Leu His
 325         330         335
Asp Tyr Leu Val Gly Thr Leu Gly Pro Tyr Val Ile Asn Val Thr Lys
 340         345         350
Ala Asp Met Ala Cys Ser His Gln Arg Cys His Gly His Gly Arg Cys
 355         360         365
Ala Arg Lys Asp Pro Gly Gln Met Glu Ala Phe Leu His Leu Gln Pro
 370         375         380
Asp Asp Ser Leu Gly Ala Trp Asn Ser Phe Arg Cys His Cys Tyr Ser
 385         390         395         400
Gly Trp Ala Gly Pro Thr Cys Leu Glu Pro Lys Pro
 405         410

```

5

```

<210> 20
<211> 435
<212> PRT
<213> Sus scrofa

```

10

```

<220>
<223> Hialuronidasa

<400> 20

```


Met Ala Ala His Leu Leu Pro Ile Cys Thr Leu Phe Leu Asn Leu Leu
1 5 10 15
Ser Val Ala Gln Gly Ser Arg Asp Pro Val Val Leu Asn Arg Pro Phe
20 25 30
Thr Thr Ile Trp Asn Ala Asn Thr Gln Trp Cys Leu Lys Arg His Gly
35 40 45
Val Asp Val Asp Val Ser Val Phe Glu Val Val Val Asn Pro Gly Gln
50 55 60
Thr Phe Arg Gly Pro Asn Met Thr Ile Phe Tyr Ser Ser Gln Leu Gly
65 70 75 80
Thr Tyr Pro Tyr Tyr Thr Ser Ala Gly Glu Pro Val Phe Gly Gly Leu
85 90 95
Pro Gln Asn Ala Ser Leu Asp Val His Leu Asn Arg Thr Phe Lys Asp
100 105 110
Ile Leu Ala Ala Met Pro Glu Ser Asn Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile
115 120 125
Asp Trp Glu Ala Trp Arg Pro Arg Trp Ala Phe Asn Trp Asp Ala Lys
130 135 140
Asp Ile Tyr Arg Gln Arg Ser Arg Ala Leu Val Gln Lys Gln His Pro
145 150 155 160
Asp Trp Pro Ala Pro Trp Val Glu Ala Ala 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> 21
<211> 419
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<220>
<223> Hialuronidasa 3

<400> 21

```

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

```

<210> 22
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <223> Hialuronidasa 1

<400> 22

```

Met Lys Pro Phe Ser Pro Glu Val Ser Pro Asp Pro Cys Pro Ala Thr
 1      5      10      15
Ala Ala His Leu 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 Leu Glu His
      305      310      315      320
Ser Leu Gly Glu Ser Ala Ala Gln Gly Ala Ala Gly Ala Val Leu Trp
      325      330      335
Ile Ser Ser Glu Lys Thr Ser Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile Lys
      340      345      350
Ala Tyr Met Asp Ser Thr Leu Gly Pro Phe Ile Leu Asn Val Thr Ser
      355      360      365
Ala Ala Leu Leu Cys Ser Glu Ala Leu Cys Ser Gly Arg Gly Arg Cys
      370      375      380
Val Arg His Pro Ser Tyr Pro Glu Ala Leu Leu Thr Leu Ser Pro Ala
      385      390      395      400
Ser Phe Ser Ile Glu Pro Thr His Asp Gly Arg Pro Leu Ser Leu Lys
      405      410      415
Gly Thr Leu Ser Leu Lys Asp Arg Ala Gln Met Ala Met Lys Phe Lys
      420      425      430
Cys Arg Cys Tyr Arg Gly Trp Ser Gly Glu Trp Cys Lys Lys Gln Asp
      435      440      445
Met

```

<210> 23
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <223> Hialuronidasa 2

<400> 23

```

Met Arg Ala Gly Leu Gly Pro Ile Ile Thr Leu Ala Leu Val Leu Glu
 1      5      10      15
Val Ala Trp Ala Ser Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr
 20      25      30
Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asn Val Pro Thr Gln Glu Cys Ala
 35      40      45
Pro Arg His Lys Val Pro Leu Asp Leu Arg Ala Phe Asp Val Glu Ala
 50      55      60
Thr Pro Asn Glu Gly Phe 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> 24
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <223> Hialuronidasa 3
 <400> 24

ES 2 673 093 T3

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

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

<220>
<223> PH20 precursor de conejo
<400> 25

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Gly Ser Ala Val Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Gly Val Phe Gln Ile Val Phe Ile Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Ala Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Thr Glu Phe Cys Leu Gly Lys Ser
 50 55 60
 Gly Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Leu Phe Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Lys Asn Lys Thr Gly Gln Gly Ile Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Pro His Thr Gly Ala Ile Val His Gly
 100 105 110
 Arg Ile Pro Gln Leu Gly Pro Leu Gln Gln His Leu Thr Lys Leu Arg
 115 120 125
 Gln Glu Ile Leu Tyr Tyr Met Pro Lys Asp Asn Val Gly Leu Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Leu Pro Thr Trp Leu Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Ile Tyr Arg Ile Lys Ser Ile Glu Leu Val Lys Ser Gln His
 165 170 175
 Pro Gln Tyr Asn His Ser Tyr Ala Thr Glu Lys Ala Lys Arg Asp Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Gly Arg
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Asp Lys Pro Asn Leu Tyr Lys Gly Ser Cys Phe
 225 230 235 240
 Asp Ile Glu Lys Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Lys Glu
 245 250 255
 Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Ala Arg Ser
 260 265 270
 Ala Thr Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Val Val Arg Asn Arg Val His Glu
 275 280 285
 Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile Pro Asp Asp Lys Ser Pro Leu Pro Asn
 290 295 300
 Phe Val Tyr Thr Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Ile Phe Gln Phe Leu
 305 310 315 320
 Ser His His Asp Leu Val Tyr Thr Ile Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly
 325 330 335
 Ala Ser Gly Ile Val Val Trp Gly Ser Gln Ser Leu Ala Arg Ser Met
 340 345 350
 Lys Ser Cys Leu His Leu Asp Asn Tyr Met Lys Thr Ile Leu Asn Pro
 355 360 365
 Tyr Leu Ile Asn Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Asn Gln Val Leu
 370 375 380
 Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys Thr Arg Lys Asn Trp Asn Pro Asn Asp
 385 390 395 400
 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> 26
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

5

<220>
 <223> Hialuronidasa 2

<400> 26
 Met Trp Thr Gly Leu Gly Pro Ala Val Thr Leu Ala Leu Val Leu Val
 1 5 10 15
 Val Ala Trp Ala Thr Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr
 20 25 30
 Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asp Val Pro Thr Gln Asp Cys Gly
 35 40 45
 Pro Arg His Lys Met Pro Leu Asp Pro Lys Asp Met Lys Ala Phe Asp
 50 55 60
 Val Gln Ala Ser Pro Asn Glu Gly Phe Val Asn Gln Asn Ile Thr Ile
 65 70 75 80
 Phe Tyr Arg Asp Arg Leu Gly Met Tyr Pro His Phe Asn Ser Val Gly
 85 90 95
 Arg Ser Val His Gly Gly Val Pro Gln Asn Gly Ser Leu Trp Val His
 100 105 110
 Leu Glu Met Leu Lys Gly His Val Glu His Tyr Ile Arg Thr Gln Glu
 115 120 125
 Pro Ala Gly Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Asp Trp Arg Pro Val Trp
 130 135 140
 Val Arg Asn Trp Gln Asp Lys Asp Val Tyr Arg Arg Leu Ser Arg Gln
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Ser His 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 Ala
 435 440 445
 Ala Gly Gly Ala Ser Gly Ala Trp Ala Gly Ser His Leu Thr Gly Leu
 450 455 460
 Leu Ala Val Ala Val Leu Ala Phe Thr Trp Thr Ser
 465 470 475

10

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

5

<220>
 <223> Secuencia parcial de PH20

10

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

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

15

<220>
 <223> Hialuronidasa 3

20

<400> 28
 Met Thr Thr Arg Leu Gly Pro Ala Leu Val Leu Gly Val Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 Leu Gly Cys Gly Gln Pro Leu Pro Gln Val Pro Glu Arg Pro Phe Ser
 20 25 30
 Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala His Cys Lys Ser Arg Phe Gly Val
 35 40 45
 His Leu Pro Leu Asn Ala Leu Gly Ile Ile Ala Asn Arg Gly Gln His
 50 55 60
 Phe His Gly Gln Asn Met Thr Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Pro Tyr Phe Gly Pro Lys Gly Thr Ala His Asn Gly Gly Ile Pro
 85 90 95
 Gln Ala Leu Pro Leu Asp Arg His Leu Ala Leu Ala Ala Tyr Gln Ile
 100 105 110
 His His Ser Leu Arg Pro Gly Phe Ala Gly Pro Ala Val Leu Asp Trp
 115 120 125
 Glu Glu Trp Cys Pro Leu Trp Ala Gly Asn Trp Gly Arg Arg Arg Ala
 130 135 140
 Tyr Gln Ala Ala Ser Trp Ala Trp Ala Gln Gln Val Phe Pro Asp Leu
 145 150 155 160
 Asp Pro Gln Glu Gln Leu Tyr Lys Ala Tyr Thr Gly Phe Glu Gln Ala
 165 170 175
 Ala Arg Ala Leu Met Glu Asp Thr Leu Arg Val Ala Gln Ala Leu Arg
 180 185 190
 Pro His Gly Leu Trp Gly Phe Tyr His Tyr Pro Ala Cys Gly Asn Gly
 195 200 205
 Trp His Ser Met Ala Ser Asn Tyr Thr Gly Arg Cys His Ala Ala Thr


```

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

```

<210> 29

<211> 510

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<223> PH20 precursor de mono Cynomolgus

<400> 29

```

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

```

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

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

<220>
 <223> PH20 precursor de cobaya

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

```

      115      120      125
Asp Ile Leu Phe Tyr Met Pro Thr Asp Ser Val Gly Leu Ala Val Ile
130      135      140
Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Thr Arg Asn Trp Arg Pro Lys
145      150      155      160
Asp Ile Tyr Arg Asn Lys Ser Ile Glu Leu Val Lys Ser Gln His Pro
      165      170      175
Gln Tyr Asn His Ser Tyr Ala Val Ala Val Ala Lys Arg Asp Phe Glu
      180      185      190
Arg Thr Gly Lys Ala Phe Met Leu Glu Thr Leu Lys Leu Gly Lys Ser
      195      200      205
Leu Arg Pro Ser Ser Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr
      210      215      220
Asn Thr His Phe Thr Lys Pro Asn Tyr Asp Gly His Cys Pro Pro Ile
      225      230      235      240
Glu Leu Gln Arg Asn Asn Asp Leu Gln Trp Leu Trp Asn Asp Ser Thr
      245      250      255
Ala Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Val Arg Ser Ser Gln
      260      265      270
Asn Gly Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val His Glu Ser Ile Arg Val
      275      280      285
Ser Lys Leu Met Asp Asp Lys Asn Pro Leu Pro Ile Tyr Val Tyr Ile
      290      295      300
Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Thr Thr Thr Phe Leu Glu Leu Asp Asp
      305      310      315      320
Leu Val His Ser Val Gly Glu Ile Val Pro Leu Gly Val Ser Gly Ile
      325      330      335
Ile Ile Trp Gly Ser Leu Ser Leu Thr Arg Ser Leu Val Ser Cys Ile
      340      345      350
Gly Leu Glu Asn Tyr Met Lys Gly Thr Leu Leu Pro Tyr Leu Ile Asn
      355      360      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Gly Gln Val Leu Cys Lys Asn Gln
      370      375      380
Gly Ile Cys Thr Arg Lys Asp Trp Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Leu
      385      390      395      400
Asn Ala Thr Asn Phe Asp Ile Glu Leu Gln Gln Asn Gly Lys Phe Val
      405      410      415
Val His Gly Lys Pro Ser Leu Glu Asp Leu Gln Glu Phe Ser Lys Asn
      420      425      430
Phe His Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Val Ala Cys Lys Asp Arg Leu Asp
      435      440      445
Val His Asn Val Arg Ser Val Asn Val Cys Thr Ala Asn Asn Ile Cys
      450      455      460
Ile Asp Ala Val Leu Asn Phe Pro Ser Leu Asp Asp Asp Asp Glu Pro
      465      470      475      480
Pro Ile Thr Asp Asp Thr Ser Gln Asn Gln Asp Ser Ile Ser Asp Ile
      485      490      495
Thr Ser Ser Ala Pro Pro Ser Ser His Ile Leu Pro Lys Asp Leu Ser
      500      505      510
Trp Cys Leu Phe Leu Leu Ser Ile Phe Ser Gln His Trp Lys Tyr Leu
      515      520      525

```

Leu
 <210> 31
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <223> PH20 precursor de rata

<400> 31

Met 1	Gly	Glu	Leu	Gln	Phe	Lys	Trp	Leu	Phe	Trp	Arg	Ser	Phe	Ala	Glu
Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Gln	Thr	Val	Leu	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile	Pro	Tyr
Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala	Thr	Pro	Val	Leu	Ser	Asp	Thr	Thr
Phe	Val	Trp	Val	Trp	Asn	Val	Pro	Thr	Glu	Ala	Cys	Val	Glu	Asn	Val
Thr	Glu	Pro	Ile	Asp	Leu	Ser	Phe	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg
Lys	Thr	Ala	Ile	Gly	Gln	Pro	Val	Thr	Leu	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg	Leu
Gly	Asn	Tyr	Pro	His	Ile	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	His	His	Gly	Gly
Ile	Pro	Gln	Lys	Gly	Asp	Leu	Thr	Thr	His	Leu	Val	Lys	Ala	Lys	Glu
Asp	Val	Glu	Arg	Tyr	Ile	Pro	Thr	Asp	Lys	Leu	Gly	Leu	Ala	Ile	Ile
Asp	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Met	Arg	Asn	Trp	Thr	Pro	Lys
Asp	Ile	Tyr	Arg	Asn	Lys	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Ala	Ala	Asp	Pro
Ala	Ile	Asn	Ile	Thr	Glu	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Lys	Ala	Gln	Phe	Glu
Gly	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Met	Glu	Gly	Thr	Leu	Lys	Leu	Gly	Lys	His
Ile	Arg	Pro	Lys	His	Leu	Trp	Gly	Phe	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys	Tyr
Asn	Asn	Lys	Phe	Gln	Val	Asp	Asn	Tyr	Asp	Gly	Gln	Cys	Pro	Asp	Val
Glu	Lys	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Asp	Trp	Leu	Trp	Lys	Glu	Ser	Thr
Gly	Leu	Tyr	Pro	Ser	Val	Tyr	Leu	Lys	Lys	Asp	Leu	Lys	Ser	Ser	Arg
Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Tyr	Arg	Val	Leu	Glu	Ser	Ile	Arg	Val
Ser	Lys	Val	Ser	Asp	Glu	Ser	Asn	Pro	Val	Pro	Ile	Phe	Val	Tyr	Ile
Arg	Leu	Val	Phe	Thr	Asp	His	Val	Ser	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Asp	Asp
Leu	Val	Asn	Thr	Ile	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Gly	Ile
Ile	Ile	Trp	Asp	Ala	Met	Ser	Leu	Ala	Gln	Arg	Ser	Ala	Gly	Cys	Pro
Ile	Leu	Arg	Gln	Tyr	Met	Lys	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Val	Asn
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Thr	Leu	Cys	Lys	Glu	Lys
Gly	Met	Cys	Ser	Arg	Lys	Thr	Glu	Ser	Ser	Asp	Ala	Tyr	Leu	His	Leu
Asp	Pro	Ser	Ser	Phe	Ser	Ile	Asn	Val	Thr	Glu	Ala	Gly	Lys	Tyr	Glu
Val	Leu	Gly	Lys	Pro	Glu	Val	Lys	Asp	Leu	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	His
Phe	Lys	Cys	Ser	Cys	Phe	Ser	Lys	Met	Thr	Cys	Glu	Glu	Thr	Ser	Asp
Met	Arg	Ser	Ile	Gln	Asp	Val	Asn	Val	Cys	Met	Gly	Asp	Asn	Val	Cys
Ile	Lys	Ala	Thr	Leu	Gly	Pro	Asn	Ser	Ala	Phe	His	Leu	Leu	Pro	Gly
Lys	Gly	Leu	Leu	Leu	Met	Thr	Thr	Leu	Ala	His	Ile	Leu	His	His	Leu
Pro	His	Asp	Ile	Phe	Val	Phe	Pro	Trp	Lys	Met	Leu	Val	Ser	Thr	Pro
			500					505					510		

5 <210> 32
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>

<223> PH20 precursor de ratón

<400> 32

```

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

```

<210> 33

<211> 807

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<223> Hialuronidasa

5

<400> 33

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

Ala Tyr Gly Val Val Leu Leu Glu Gly Ile Ser Gln Met Met Pro Met
 305 310 315 320
 Ile Lys Glu Thr Pro Phe Asn Asp Lys Thr Gln Asn Asp Thr Thr Leu
 325 330 335
 Lys Ser Trp Ile Asp Asp Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Glu
 340 345 350
 Met Met Asp Leu Ser Arg Gly Arg Ala Ile Ser Arg Glu Asn Glu Thr
 355 360 365
 Ser His Ser Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ser
 370 375 380
 Asp Ala Met Asp Asp Ser Thr Lys Ala Lys Tyr Lys Lys Ile Val Lys
 385 390 395 400
 Ser Ser Val Glu Ser Asp Ser Ser Tyr Lys Gln Asn Asp Tyr Leu Asn
 405 410 415
 Ser Tyr Ser Asp Ile Asp Lys Met Lys Ser Leu Met Thr Asp Asn Ser
 420 425 430
 Ile Ser Lys Asn Gly Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met
 435 440 445
 Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu
 450 455 460
 Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu
 465 470 475 480
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn
 485 490 495
 Ser Asp Val Lys His Tyr His Asp Asn Phe Trp Val Thr Ala Asp Met
 500 505 510
 Lys Arg Leu Ser Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu Ile Leu Lys Asp
 515 520 525
 Thr Asp Asp Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Val
 530 535 540
 Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys
 545 550 555 560
 Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val
 565 570 575
 Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val
 580 585 590
 Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr Asp
 595 600 605
 Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asp Asn Gln Glu Asn Asn Ser Val Phe
 610 615 620
 Leu Glu Ser Thr Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asn
 625 630 635 640
 Lys Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Lys
 645 650 655
 Glu Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu Tyr Tyr
 660 665 670
 Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Ser Asp Asn Lys Tyr Gly Tyr Val
 675 680 685
 Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Val Phe Lys Thr Lys Lys Asp Glu
 690 695 700
 Val Thr Val Val Lys Gln Glu Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp Asn
 705 710 715 720
 Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asn Ser Thr Gln Thr Phe
 725 730 735
 Asp Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met Phe Ile
 740 745 750
 Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn Pro
 755 760 765
 Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser Met Thr
 770 775 780
 Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Thr Ser Asn Glu Ser Gly
 785 790 795 800
 Val His Phe Glu Leu Thr Lys
 805

<210> 34

<211> 371

<212> PRT

<213> Bacteriófago H4489A de Streptococcus pyogenes

<220>

<223> Hialuronidasa

<400> 34

```

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

```

<210> 35

<211> 1628

<212> PRT

<213> Clostridium perfringens

<220>

<223> Hialuronidasa

<400> 35

5

10

ES 2 673 093 T3

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

435	440	445
Glu Ala Asn Lys Ser Ala Leu	Phe Ala Ile Ala Asp Tyr Ala Trp Asn	
450	455	460
Ile Trp Asp Asn Lys Glu Glu	Ala Asp Glu Asn Trp Asn Asp Ser Phe	
465	470	475
Lys Tyr Met Asp His Gly Thr	Ala Glu Glu Thr Asn Ser Ser Leu Ala	480
	485	490
Leu Arg Glu Ile Ser Lys His Met	Ile Asn Gln Asn Met Asp Gly Arg	495
	500	505
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
Lys Asn Asn Pro Gly Asn Glu Arg	Thr Arg Asp Gln Ile Ile Tyr Trp	
	565	570
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
Val Pro Phe Ile Lys Ser Met Gly	Gln Asn Leu Ser Val Val Ile Gly	
	645	650
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
Phe Leu Met Gly Ala Asn Ser Asn	Pro Asn Asp Thr Met Gln Lys Ala	
	725	730
Lys Ile Gln Tyr Thr Val Asp Gly	Arg Glu Trp Ile Asp Leu Glu Glu	
	740	745
Gly Val Glu Tyr Thr Met Pro Gly	Ala Ile Lys Val Glu Asn Leu Asp	
	755	760
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
Asn Ser Gly Val Glu Phe Asn Pro	Ser Leu Ile Arg Ser Glu Ser Trp	
	805	810
Gln Val Tyr Glu Gly Asn Glu Ala	Asn Leu Leu Asp Gly Asp Asn Asn	
	820	825
Thr Gly Val Trp Tyr Lys Thr Leu	Asn Gly Asp Thr Ser Leu Ala Gly	
	835	840
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
Lys Phe Lys Leu Glu Tyr Ser Leu	Asn Glu Ser Trp Thr Thr Ile	
	885	890
Lys Glu Tyr Asp Lys Thr Gly Ala	Pro Ala Gly Lys Asp Val Ile Glu	
	900	905
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 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> 36

<211> 435

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hialuronidasa-1 [Precursora]

<400> 36

```

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

```

```

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

```

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

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

```

<400> 37
Met Arg Ala Gly Pro Gly Pro Thr Val Thr Leu Ala Leu Val Leu Ala
1          5          10          15
Val Ala Trp Ala Met Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr
          20          25          30
Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asp Val Pro Thr Gln Asp Cys Gly
          35          40          45
Pro Arg Leu Lys Val Pro Leu Asp Leu Asn Ala Phe Asp Val Gln Ala
50          55          60
Ser Pro Asn Glu Gly Phe Val Asn Gln Asn Ile Thr Ile Phe Tyr Arg
65          70          75          80
Asp Arg Leu Gly Leu Tyr Pro Arg Phe Asp Ser Ala Gly Arg Ser Val
          85          90          95
His Gly Gly Val Pro Gln Asn Val Ser Leu Trp Ala His Arg Lys Met
          100          105          110
Leu Gln Lys Arg Val Glu His Tyr Ile Arg Thr Gln Glu Ser Ala Gly
          115          120          125
Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Asp Trp Arg Pro Val Trp Val Arg Asn
130          135          140
Trp Gln Asp Lys Asp Val Tyr Arg Arg Leu Ser Arg Gln Leu Val Ala
145          150          155          160
Ser Arg His Pro Asp Trp Pro Pro Asp Arg Ile Val Lys Gln Ala Gln
          165          170          175
Tyr Glu Phe Glu Phe Ala Ala Gln Gln Phe Met Leu Glu Thr Leu Arg
          180          185          190
Tyr Val Lys Ala Val Arg Pro Arg His Leu Trp Gly Phe Tyr Leu Phe

```

```

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

```

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

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

```

<400> 38
Met Thr Thr Gln Leu Gly Pro Ala Leu Val Leu Gly Val Ala Leu Cys
  1              5              10              15
Leu Gly Cys Gly Gln Pro Leu Pro Gln Val Pro Glu Arg Pro Phe Ser
  20              25              30
Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala His Cys Glu Ala Arg Phe Gly Val
  35              40              45
His Leu Pro Leu Asn Ala Leu Gly Ile Ile Ala Asn Arg Gly Gln His
  50              55              60
Phe His Gly Gln Asn Met Thr Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Leu Gly Leu
65              70              75              80
Tyr Pro Tyr Phe Gly Pro Arg Gly Thr Ala His Asn Gly Gly Ile Pro
              85              90              95
Gln Ala Leu Pro Leu Asp Arg His Leu Ala Leu Ala Ala Tyr Gln Ile
              100              105              110
His His Ser Leu Arg Pro Gly Phe Ala Gly Pro Ala Val Leu Asp Trp
              115              120              125
Glu Glu Trp Cys Pro Leu Trp Ala Gly Asn Trp Gly Arg Arg Arg Ala

```

```

      130      135      140
Tyr Gln Ala Ala Ser Trp Ala Trp Ala Gln Gln Val Phe Pro Asp Leu
145      150      155      160
Asp Pro Gln Glu Gln Leu Tyr Lys Ala Tyr Thr Gly Phe Glu Gln Ala
      165      170      175
Ala Arg Ala Leu Met Glu Asp Thr Leu Arg Val Ala Gln Ala Leu Arg
      180      185      190
Pro His Gly Leu Trp Gly Phe Tyr His Tyr Pro Ala Cys Gly Asn Gly
      195      200      205
Trp His Ser Met Ala Ser Asn Tyr Thr Gly Arg Cys His Ala Ala Thr
      210      215      220
Leu Ala Arg Asn Thr Gln Leu His Trp Leu Trp Ala Ala Ser Ser Ala
225      230      235      240
Leu Phe Pro Ser Ile Tyr Leu Pro Pro Arg Leu Pro Pro Ala His His
      245      250      255
Gln Ala Phe Val Arg His Arg Leu Glu Glu Ala Phe Arg Val Ala Leu
      260      265      270
Val Gly His Arg His Pro Leu Pro Val Leu Ala Tyr Val Arg Leu Thr
      275      280      285
His Arg Arg Ser Gly Arg Phe Leu Ser Gln Asp Asp Leu Val Gln Ser
      290      295      300
Ile Gly Val Ser Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Val Leu Trp Gly
305      310      315      320
Asp Leu Ser Leu Ser Ser 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> 39
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Hialuronidasa-4

```

<400> 39
Met Lys Val Leu Ser Glu Gly Gln Leu Lys Leu Cys Val Val Gln Pro
1      5      10      15
Val His Leu Thr Ser Trp Leu Leu Ile Phe Phe Ile Leu Lys Ser Ile
      20      25      30
Ser Cys Leu Lys Pro Ala Arg Leu Pro Ile Tyr Gln Arg Lys Pro Phe
      35      40      45
Ile Ala Ala Trp Asn Ala Pro Thr Asp Gln Cys Leu Ile Lys Tyr Asn
      50      55      60
Leu Arg Leu Asn Leu Lys Met Phe Pro Val Ile Gly Ser Pro Leu Ala
      65      70      75      80
Lys Ala Arg Gly Gln Asn Val Thr Ile Phe Tyr Val Asn Arg Leu Gly
      85      90      95
Tyr Tyr Pro Trp Tyr Thr Ser Gln Gly Val Pro Ile Asn Gly Gly Leu
      100      105      110
Pro Gln Asn Ile Ser Leu Gln Val His Leu Glu Lys Ala Asp Gln Asp

```

```

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

```

<210> 40

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-467

<400> 40

```

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

```


ES 2 673 093 T3

```

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

```

<210> 41

<211> 477

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-477

<400> 41

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1      5      10      15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20      25      30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35      40      45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50      55      60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65      70      75      80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85      90      95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100      105      110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115      120      125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130      135      140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145      150      155      160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165      170      175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180      185      190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195      200      205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210      215      220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225      230      235      240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245      250      255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260      265      270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275      280      285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290      295      300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305      310      315      320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325      330      335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340      345      350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355      360      365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370      375      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> 42
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-478
 <400> 42

```

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

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

```

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

10 <220>
 <223> PH20 precursor 1-479

<400> 43

```

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

```

5

<210> 44

<211> 480

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-480

10

<400> 44

```

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

```

5

<210> 45

<211> 481

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-481

10

<400> 45

```

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

```

5

<210> 46

<211> 483

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> PH20 precursor 1-483

<400> 46

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> 47

<211> 432

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 madura 36-467

5

<400> 47

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

<210> 48

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 madura 36-483

10

15

<400> 48

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

<210> 49

<211> 1446

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ADN que codifica rHuPH20 "precursora" soluble

<400> 49

```

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

```

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

<220>
 <223> PH20 variante P48A

```

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

```

```

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

```

<210> 51
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 variante L499W precursora

```

<400> 51
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1                                5                                10                                15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
                                20                                25                                30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
                                35                                40                                45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50                                55                                60

```

ES 2 673 093 T3

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

<210> 52

<211> 6630

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vector HZ24

<400> 52

tcaatatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta	60
ttggccattg	catacgttgt	atctatatca	taatatgtac	atztatattg	gctcatgtcc	120
aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gactagttat	taatagtaat	caattacggg	180
gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	240
gcctggctga	ccgcccacg	acccccgcc	attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	300
agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtatttac	ggtaaactgc	360
ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcatat	gccaaagtccg	ccccctattg	acgtcaatga	420
cggtaaatgg	cccgcctggc	attatgcccc	gtacatgacc	ttacgggact	ttcctacttg	480
gcagtatcat	tacgtattag	tcactcgctat	taccatgggtg	atgcggtttt	ggcagtacac	540
caatggcggt	ggatagcggt	ttgactcacg	gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	600
caatgggagt	ttgttttggc	acaaaaatca	acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaataaacc	660
cgcccgcgtt	acgcaaatgg	gcggtaggcg	tgtacgggtg	gaggtctata	taagcagagc	720
tcgttttagtg	aaccgtcaga	tcactagaag	ctttattgctg	gtagtttatc	acagttaaat	780
tgctaacgca	gtcagtgcct	ctgacacaac	agctctgaac	ttaagctgca	gaagtgggtc	840
gtgaggcact	gggcaggtaa	gtatcaagggt	tacaagacag	gtttaaggag	accaatagaa	900
actgggcttg	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	taggcaccta	ttggtcttac	960
tgacatccac	tttgccctttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	acagctctta	1020
aggctagagt	acttaatac	actcactata	ggctagcatg	ggagtgtctaa	aattcaagca	1080
catcttttttc	agaagctttg	ttaaatcaag	tggagtatcc	cagatagttt	tcaccttcc	1140
tctgattcca	tgttgcttga	ctctgaattt	cagagcacct	cctgttattc	caaatgtgcc	1200
tttcctctgg	gcctggaatg	ccccaaagtga	attttgtctt	ggaaaatttg	atgagccact	1260
agatatgagc	ctcttctctt	tcataggaag	cccccgata	aacgccaccg	ggcaaggtgt	1320
tacaatatatt	tatgttgata	gacttggcta	ctatccttac	atagattcaa	tcacaggagt	1380
aactgtgaat	ggaggaatcc	cccagaagat	ttcctttacaa	gacctctg	acaaaagctaa	1440
gaaagacatt	acattttata	tgccagtaga	caatttggga	atggctgtta	ttgactggga	1500
agaatggaga	cccacttggg	caagaaactg	gaaaccta	gatgtttaca	agaatagggtc	1560
tattgaattg	gttcagcaac	aaaatgtaca	acttagtctc	acagaggcca	ctgagaaagc	1620
aaaacaagaa	tttgaaaagg	cagggaagga	tttcctggta	gagactataa	aattgggaaa	1680
attacttcgg	ccaaatcact	tgtggggtta	ttatcttttt	ccggattgtt	acaacctaca	1740
ctataagaaa	cccgggttaca	atggaagtgt	cttcaatgta	gaaataaaaa	gaaatgatga	1800
tctcagctgg	ttgtggaatg	aaagcactgc	tctttaccca	tccattttat	tgaacactca	1860
gcagtctcct	gtagctgcta	cactctatgt	gcgcaatcga	gttcgggaag	ccatcagagt	1920
ttccaaaata	cctgatgcaa	aaagtccact	tccggttttt	gcataatacc	gcatagtttt	1980
tactgatcaa	gttttgaaat	tcctttctca	agatgaactt	gtgtatacat	ttggcgaaac	2040
tggtgtctctg	ggtgcttctg	gaattgtaat	atggggaacc	ctcagtataa	tgcgaagtat	2100
gaaatcttgc	ttgtctcctag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
cgtcacacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgccttgc	caggagcaag	gagtgtgtat	2220
aaggaaaaaac	tgggaattcaa	gtgactatct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgtctattca	2280
acttgagaaa	ggtggaaagt	tcacagtacg	tggaaaaccg	acacttgaag	acctggagca	2340
atthttctgaa	aaattttatt	gcagctgtta	tagcaccttg	agttgttaag	agaaaagctga	2400
tgtaaaagac	actgatgctg	ttgatgtgtg	tattgctgat	ggtgtctgta	tagatgcttt	2460
tctaaaacct	cccattggaga	cagaagaacc	tcaaattttc	tactgaggat	ccatagctaa	2520
cgccctctct	cctccccccc	ccctaaccgtt	actggccgaa	gccgcttggg	ataaggccgg	2580
tgtgcgtttg	tctatatgtt	atthttccacc	atattgccgt	cttttggcaa	tgtgagggcc	2640
cggaaaacctg	gccctgtctt	cttgacgagc	attcctaggg	gtctttcccc	tctcgccaaa	2700
ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ttcttgaaga	2760
caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcggaacc	ccccacctgg	cgacaggtgc	2820
ctctgcggcc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggcggcaca	acccagtgct	2880
cacgttgtga	gttgatagtg	tgtggaaaga	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgtattcaac	2940
aaggggctga	aggatgcccc	gaaggtaccc	cattgtatgg	gatctgatct	ggggcctcgg	3000
tgcacatgct	ttacatgtgt	ttagtcgagg	ttaaaaaac	gtctaggccc	cccgaaccac	3060
ggggacgtgg	ttttcctttg	aaaaacacga	tgataagctt	gccacaaccc	acagcgcccg	3120
ctgccatcat	ggttcgacca	ttgaactgca	tcgtcgccgt	gtcccaaat	atggggattg	3180
gcaagaacgg	agacctaccc	tggcctccgc	tcaggaacga	gttcaagtac	ttccaaagaa	3240
tgaccacaac	ctcttcagt	gaaggtaaac	agaatctggg	gattatgggt	aggaaaacct	3300
ggttctccat	tcctgagaag	aatcgacctt	taaaggacag	aattaatata	gttctcagta	3360
gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	atthttcttgc	caaaagtttg	gatgatgcct	3420
taagacttat	tgaacaaccg	gaattggcaa	gtaaagtaga	catgggtttg	atagtcggag	3480
gcagttctgt	ttaccaggaa	gccatgaatc	aaccaggcca	cctcagactc	tttgtgacaa	3540

ES 2 673 093 T3

```

ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttccaga aattgatttg gggaaatata 3600
aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca ggaggaaaaa ggcacaaagt 3660
ataagtttga agtctacgag aagaaagact aaacgcgtgg tacctctaga gtcgacccgg 3720
gcgcccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 3780
aatgcagtgga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 3840
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcagggt 3900
tcagggggag atgtggggag ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtataaat 3960
cgataaggat ccgggctggc gtaatagcga agaggcccg accgatcgcc cttcccaaca 4020
gttgcgcgag ctgaatggcg aatggacgag ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcggggt 4080
gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 4140
gctttcttcc cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg 4200
gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4260
tagggtagtg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg 4320
ttggagtcca cgttctttta tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaacctt 4380
atctcggctc attccttttg tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 4440
aatgagctga ttttaacaaa atttaacgag aattttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
tcctgatgag gtattttctc cttacgcata tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 4560
ctctcagtag aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4620
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tccgggcata cgtttacaga caagctgtga 4680
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcacgcgc atcacgaaa cgcgcgagac 4740
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt 4800
agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttattt cccttttttg 4980
cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt ggtgacacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat 5160
gtggcgcggt attatcccg attgacgcgg ggcaagagca actcggctgc cgcatacact 5220
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataaact gcgggccact 5340
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg 5400
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 5460
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaact 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 ctgattaaag attgtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttogttccac tgagcgctag 5940
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 6000
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggttg tttgccggat caagagctac 6060
caactctttt tccgaaggta actggcttca cagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt 6240
tggaactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 6300
gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaaag cgccacgctt ccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgaggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttgcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctct gccttttctg 6600
ggccttttgc tcacatggct cgacagatct 6630

```

<210> 53
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> dihidrofolato reductasa

<400> 53
 Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly Ile

1	5	10	15
Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe Lys			
	20	25	30
Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln Asn			
	35	40	45
Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys Asn			
	50	55	60
Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Lys			
	65	70	75
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
Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile Lys			
	165	170	175
Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp			
	180	185	

<210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> etiqueta His

<400> 54
 His His His His His His
 1 5

<210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> etiqueta Flag

<400> 55
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 56
 <211> 1449
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Secuencia de ARNm de Gen2

<400> 56
 atgggagtg c taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtgaggta 60

```

tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
cttggaataa ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tggtacaata ttttatgttg atagacttg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtggg ttattatcct 660
tttccggatt gttacaacca tcaactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tgggtgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattccttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttgccga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctacagcca aaatgtgtag tcaagtgtt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactga

```

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-447

<400> 57

```

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

```

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-446

<400> 58

```

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
  1           5           10           15

```

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-445

<400> 59

```

Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
  1           5           10           15

```

<210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
 <223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-444
 5
 <400> 60
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
 1 5 10
 <210> 61
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-443
 15
 <400> 61
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 1 5 10
 <210> 62
 20 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <223> péptido C-terminal escindido de rHuPH20 soluble aa 431-442
 <400> 62
 Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu
 1 5 10
 30 <210> 63
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> Ovis aries
 35 <220>
 <223> PH20
 <400> 63
 Leu Asp Phe Pro Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser Phe Leu Trp
 40

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
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
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
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
Gly Asn Tyr	Asn 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
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
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> 64
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<220>

<223> PH20 precursor de vaca

<400> 64

```

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

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

```

<210> 65

<211> 517

<212> PRT

<213> Ovis aries

<220>
<223> PH20

5

<400> 65
 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> 66
 <211> 1620
 <212> ADN
 <213> Ovis aries

<220>
 <223> PH20 de oveja codificante

<400> 66
 ttttccgtgt tgggttggtc tggacttcag agcaccocct ctcatattcaa acacttcttt 60
 cctctgggccc tggaaatgcc cagctgaacg ttgtattaaa atcttttaaac tacctccaga 120
 tctgaagactc ttctctgtaa aaggaagccc ccaaaaaagt gctacgggac aatttattac 180
 attattttat gctgatagac ttggctacta tcctcatata gatgaaaaaa caggcaaacac 240
 tgtatatgga ggaattcccc agttgggaaa cttaaaaaat catttggaiaa aagccaaaaa 300
 agacattgcc tattacatac caaatgacag cgtgggcttg gcggtcattg actgggaaaa 360
 ctggagggcct acctgggcaa gaaactggaa acctaaagat gtttacaggg atgagtctgt 420
 tgagttgggt ctgcaaaaaa atccacaact cagtttccca gaggcttcca agattgcaaa 480
 agtggatttt gagacagcag gaaagagttt catgcaagag actttaaaac tgggaaaatt 540
 acttcggcca aatcacttat ggggttatta tctttttcct gattgttaca atcataatta 600
 taaccagcct acttacaatg gaaattgctc tgatttagaa aaaaggagaa atgatgatct 660
 cgactgggtg tggaaaggaaa gcactgccct tttcccttct gtttatttga atatcaagtt 720
 aaaatctact ccaaaagctg ccttctatgt tcgtaatcgt gtccaggaag ccattcgggt 780
 gtctaaaata gcgagtgttg aaagtccact tcccgttttt gtatatcacc gtccagtttt 840
 tactgatggg tcttcaacat acctttctca gggtgacctt gtgaattcgg ttggtgagat 900
 cggtgctcta ggtgcctctg ggattataat gtggggcagt ctcaatctaa gcctaactat 960
 gcaatcttgc atgaacctag gcaattactt gaacactaca ctgaatcctt acataatcaa 1020
 cgtcacccta gcagccaaaa tgtgcagcca agtgctttgc cacgatgaag gagtgtgtac 1080
 aaggaaacaa tggaaattcaa gcgactatct tcacctgaac ccaatgaatt ttgctattca 1140
 aactgggaaa ggtggaaaat acacagtacc tgggaaagtc aacttgaaag acctgcaaac 1200
 gttttctgat aaattttatt gcagttgtta tgccaacatc aactgtaaga agagagttga 1260
 tataaaaaat gttcatagtg ttaatgtatg tatggcagaa gacatttgta tagaggggccc 1320
 tgtgaagtta caaccagtg atcattcctc tagccagaat gaggcactca ctaccaccgt 1380
 cagcagtatc tcacctctca ctacagccac cacagtatct ccatgtactc ctgagaaaca 1440
 gtcccctgag tgccctcaaag tcaggtgttt ggaagccatc gccaacgtca cccaaacggg 1500
 gtgtcaaggt gttaaattga agaactctc cagtcagtca agtattcaaa atattaaaaa 1560
 tcaaacaacc tattaaaata taaattcagt gcttataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620

<210> 67
 <211> 793
 <212> PRT
 <213> Arthrobacter sp.
 <220>
 <223> hialuronano liasa (cepa FB24)

<400> 67

```

Met Thr Arg Glu Phe Ser Arg Arg Thr Ala Leu Lys Gly Ala Ala Leu
 1      5      10      15
Ser Gly 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	
					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				</					

<210> 68
<211> 557
<212> PRT
<213> Bdellovibrio bacteriovorus

<220>
<223> hialuronano liasa

<400> 68
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
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
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
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
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
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
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> 69
 <211> 813
 <212> PRT
 <213> Propionibacterium acnes
 <220>

<223> hialuronano liasa

<400> 69

```

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 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	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> 70

<211> 1072

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 70

```

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

```

[illegible]

<211> 1072
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae 18RS21

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

<400> 71

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		

10

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> 72
 <211> 1081
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae serotipo Ia

<220>
 <223> hialuronano liasa

```

<400> 72
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

```

ES 2 673 093 T3

[illegible]


```

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> 73
 <211> 984
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae serotipo III

<220>
 <223> hialuronano liasa

<400> 73
 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	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 Tyr Gln Pro Gln Thr Met		
	965	970		975
Thr Lys Thr Asp Gln	Leu Ala Ile			
	980			

<210> 74
 <211> 807
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa COL)

<220>
 <223> hialuronano liasa
 <400> 74

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 Lys 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> 75
<211> 420
5 <212> PRT
<213> Staphylococcus aureus (cepa MRSA252)

<220>
10 <223> hialuronano liasa

<400> 75
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 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> 76
<211> 806
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus (cepa MRSA252)

<220>
<223> hialuronano liasa

<400> 76
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
						135					140				
Lys	Glu	Ala	Leu	Asp	Trp	Met	His	Lys	Asn	Val	Tyr	Gly	Lys	Asn	Pro
145					150					155					160
Ser	Gln	Lys	Val	Glu	Asp	Leu	Thr	Lys	Asn	Arg	Lys	Gly	Gln	Thr	Thr
				165					170					175	
Pro	Lys	Asn	Asn	Ser	Leu	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro
				180				185					190		
Arg	Ala	Leu	Thr	Asn	Thr	Leu	Leu	Met	Asp	Asp	Met	Leu	Thr	Lys	
			195				200					205			
Asp	Glu	Met	Lys	Asn	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Thr	Tyr	Ala	Pro	Ser
						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
						295					300				
Gly	Ala	Tyr	Gly	Val	Val	Leu	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser	Gln	Met	Met	Pro
305					310					315					320
Met	Ile	Lys	Glu	Ser	Pro	Phe	Lys	Thr	Thr	Gln	Asp	Asn	Ala	Thr	Leu
				325						330				335	
Ser	Asn	Trp	Ile	Asp	Glu	Gly	Phe	Met	Pro	Leu	Ile	Tyr	Lys	Gly	Glu
				340				345					350		
Met	Met	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Ala	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Glu	Thr
				355			360					365			
Ser	His	Thr	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Asn
						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
						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> 77
 <211> 815
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa MSSA476)

<220>
 <223> hialuronano liasa

```

<400> 77
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
				165					170					175
Arg	Asn	Thr	Asn	Leu	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro
			180					185						190
Ala	Leu	Thr	Asn	Thr	Leu	Ile	Leu	Leu	Asn	Asp	Gln	Phe	Ser	Asn
			195				200					205		Asp
Glu	Lys	Lys	Lys	Tyr	Thr	Ala	Pro	Ile	Lys	Thr	Phe	Ala	Pro	Glu
	210					215					220			Ser
Asp	Lys	Ile	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	Gln	Pro	Glu	Gln	Ala	Lys	Gly
	225				230					235				240
Asn	Leu	Val	Asp	Ile	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Ile	Ile
			245					250						255
Glu	Asp	Lys	Asp	Ile	Thr	Lys	Asn	Ser	Ile	Asp	Ala	Phe	Asn	Lys
			260					265					270	Val
Phe	Thr	Tyr	Val	Gln	Ser	Asn	Ala	Thr	Gly	Lys	Glu	Arg	Asn	Gly
	275						280						285	Phe
Tyr	Lys	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Gln	Asp	Val	Pro	Tyr	Thr
	290					295					300			Gly
Ala	Tyr	Gly	Val	Val	Leu	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser	Gln	Met	Met	Pro
	305				310					315				320
Ile	Lys	Glu	Thr	Pro	Phe	Asn	Asp	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Thr	Thr
			325						330					335
Lys	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	Thr	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu
	370					375					380			Ser
Asp	Ala	Met	Asp	Asp	Ser	Thr	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Gln	Ile	Val
	385				390					395				400
Thr	Ser	Val	Lys	Ser	Asp	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Asp	Thr	Leu
			405						410					415
Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Ser	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Met	Glu	Asp	Ser
			420					425					430	Thr
Ile	Ser	Thr	Asn	Gly	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp
		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	Ser	Ile	Asn	Gly
	465				470					475				480
Asn	Leu	Lys	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Tyr
			485						490					495
Ser	Asp	Val	Lys	His	Tyr	Arg	Asp	Asn	Phe	Trp	Ala	Thr	Ala	Asp
			500					505					510	Met
Lys	Arg	Leu	Ala	Gly	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
Thr	Leu	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile
			565						570					575
Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro
			580					585					590	Val
Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Thr
		595					600					605		Asp
Asp	Lys	Gln	Thr	Thr	Ala	Ser	Asp	Asn	Gln	Gly	Thr	Asn	Ser	Val
	610				615						620			Phe
Leu	Glu	Ser	Thr	Asn	Lys	Pro	Lys	Asn	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe
	625				630					635				640
Asn	Glu	Ser	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys
			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> 78

<211> 807

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (cepa NCTC 8325)

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 78

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 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> 79

<211> 809

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (cepa RF122 bovina)

<220>

<223> hialuronano liasa

5

<400> 79

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> 80
 <211> 807
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus (cepa RF122 bovina)

<220>
 <223> hialuronano liasa
 <400> 80

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> 81

<211> 807

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus (cepa USA300)

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 81

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	Glu	Cys	Ile	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	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

[illegible]

<210> 82
<211> 1066
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

<220>
<223> hialuronano liasa

<400>	82															
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													

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> 83
 <211> 1078
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae (cepa ATCC BAA-255/R6)

<220>
 <223> hialuronano liasa

<400> 83
 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
Lys Asp Lys Met Gln Thr Met Tyr His Trp Ile Asp Lys Ser Phe Ala		560
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
Asp Val Phe Lys Asn Leu Lys Thr Tyr Lys Asp Ile Ser Leu Met Gln		640
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
Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Gly Asp Leu Ser His Tyr Ser Asp Gly		720
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
Met Leu Lys Asp Lys Ile Ala Phe Leu Gly Ser Asn Ile Gln Asn Thr		800
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
Ile Ser Met Ser Lys Ala Leu Gln Lys Gly Ala Trp Lys Asp Ile Asn		
885	890	895
Glu Gly Gln Ser Asp Lys Glu Val Glu Asn Glu Phe Leu Thr Ile Ser		
900	905	910
Gln Ala His Lys Gln Asn Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Leu Ile Pro		
915	920	925
Asn Val Asp Arg Ala Thr Phe Asn Gln Met Ile Lys Glu Leu Glu Ser		
930	935	940
Ser Leu Ile Glu Asn Asn Glu Thr Leu Gln Ser Val Tyr Asp Ala Lys		
945	950	955
Gln Gly Val Trp Gly Ile Val Lys Tyr 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
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 Gly Ala Phe Tyr Leu Phe		
1060	1065	1070
Arg Arg Gly Lys Asn Asn		
1075		

<211> 1067

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae serotipo 2 (cepa D39/N)

5

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 84

```

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

```

10

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> 85
 <211> 805
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes serotipo M1

<220>
 <223> hialuronano liasa

```

<400> 85
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

```


[illegible]

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> 86
 <211> 780
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes serotipo M2 (cepa MGAS10)

<220>
 <223> hialuronano liasa

<400> 86
 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 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> 87

<211> 868

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M4 (cepa MGAS10)

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 87

ES 2 673 093 T3

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

[illegible]

<210> 88

<211> 828

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M6

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 88

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> 89

<211> 556

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M12 (cepa MGAS2)

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 89

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 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> 90

<211> 635

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M12 (cepa MGAS2)

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 90

ES 2 673 093 T3

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> 91

<211> 828

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M12 (cepa MGAS9)

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 91

```

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

```

[illegible]

```

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> 92

<211> 828

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes serotipo M28

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 92

```

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 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> 93
 <211> 522
 <212> PRT

<213> Streptococcus suis

<220>

<223> hialuronano liasa

5

<400> 93

```

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 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> 94
 <211> 1164
 <212> PRT
 <213> Streptococcus suis

<220>
 <223> hialuronano liasa

```

<400> 94
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

```

[illegible]

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 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> 95
<211> 1164
<212> PRT
<213> Streptococcus suis

<220>
<223> hialuronano liasa

<400> 95
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 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> 96
 <211> 802
 <212> PRT
 <213> *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601 / ES114)

<220>
 <223> hialuronano liasa

<400> 96
 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> 97

<211> 517

<212> PRT

<213> Synechococcus sp. (cepa RCC307)

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 97

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> 98
 <211> 1021
 <212> PRT
 <213> Proteus vulgaris

<220>
 <223> condroitin-sulfato-ABC endoliasa

```

<400> 98
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

```

[illegible]

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> 99
<211> 684
<212> PRT
<213> Pedobacter heparinus

<220>
<223> condroitin AC liasa

<400> 99
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> 100

<211> 844

<212> PRT

<213> Victivallis vadensis ATCC BAA-548

<220>

<223> condroitin AC liasa

<400> 100

```

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> 101
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<220>
 <223> PH20 Chimpanzé
 <400> 101

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

5

<210> 102

<211> 512

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<220>

<223> PH20 precursor de mono Rhesus

5

<400> 102

```

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> 103
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-505

```

<400> 103
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
 500 505

<210> 104

<211> 503

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-503

<400> 104

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
500

<210> 105

<211> 501

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-501

<400> 105

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
500

<210> 106

<211> 499

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-499

<400> 106

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> 107
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> PH20 precursor 1-497

<400> 107

```

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> 108

<211> 495

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-495

5

<400> 108

```

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> 109
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-493

<400> 109
 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		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		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		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		480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met				
	485		490	

<210> 110
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-489

<400> 110

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> 111
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-489

```

<400> 111
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
  1      5      10      15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
      20      25      30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
      35      40      45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe

```


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

<210> 112
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-490
 <400> 112

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> 113
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> PH20 precursor 1-487

<400> 113

```

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

```

5

<210> 114

<211> 485

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-485

5

<400> 114

```

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> 115
 <211> 484
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> PH20 precursor 1-484

<400> 115
 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

10

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> 116

<211> 476

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-476

<400> 116

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> 117

<211> 475

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-475

<400> 117

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> 118
<211> 474
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PH20 precursor 1-474

<400> 118
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> 119

<211> 473

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-473

<400> 119

```

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> 120

<211> 472

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-472

<400> 120

```

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> 121
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-471
 <400> 121

```

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> 122

<211> 470

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-470

<400> 122

```

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> 123
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-469
 <400> 123

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> 124
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-468
 <400> 124

```

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> 125
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-466
 <400> 125

```

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

```

5 <210> 126
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> PH20 precursor 1-465

<400> 126

```

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> 127

<211> 464

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-464

<400> 127

```

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

```

5

<210> 128

<211> 462

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> PH20 precursor 1-462

<400> 128

```

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
450    455    460

```

5

<210> 129

<211> 460

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-460

10

<400> 129

```

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
      450      455      460

```

5

<210> 130

<211> 458

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> PH20 precursor 1-458

<400> 130

```

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
450      455

```

5

<210> 131

<211> 456

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> PH20 precursor 1-456

<400> 131

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								
	450					455									

<210> 132

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-454

<400> 132

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										
		450													

<210> 133
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-452

<400> 133

```

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
450

```

<210> 134
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-450

<400> 134

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
450

<210> 135

<211> 508

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-508

<400> 135

```

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
 500      505

```

5

<210> 136

<211> 506

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-506

<400> 136

```

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
      500      505

```

<210> 137

<211> 504

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> PH20 precursor 1-504

5

<400> 137

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
          500

```

<210> 138

<211> 502

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-502

<400> 138

```

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
      500

```

<210> 139
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-500

```

<400> 139
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> 140
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 precursor 1-498

```

<400> 140
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		</									

<210> 141

<211> 496

<212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 220 \rangle$

<223> PH20 precursor 1-496

<400> 141

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> 142

<211> 494

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-494

<400> 142

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> 143

<211> 492

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-492

<400> 143

```

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

```

5

<210> 144

<211> 488

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-488

5

<400> 144

```

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> 145

<211> 486

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 precursor 1-486

5

<400> 145

```

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> 146
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> PH20 madura 36-507

<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 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
 465 470

<210> 147
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> PH20 madura 36-505

<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 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
 465      470
    
```

5

<210> 148
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> PH20 madura 36-503

<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 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
 465

10

5

<210> 149
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> PH20 madura 36-501

<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 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
 465

10

5

<210> 150
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> PH20 madura 36-499

<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 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

10

<210> 151

<211> 462
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> PH20 36-497

<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 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

```

10

<210> 152
 <211> 460

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-495

5

<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
450      455      460

```

10

<210> 153

<211> 458

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-493

5

<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
 450      455

```

10

<210> 154

<211> 456

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-491

5

<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
          450          455

```

<210> 155

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> PH20 36-489

<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
 450

<210> 156

<211> 455

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-490

<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									
	450					455									

<210> 157

<211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-487

<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
 450

```

5

<210> 158

<211> 450

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> PH20 36-485

<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
 450

<210> 159

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-484

<400> 159

```

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> 160
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-476
 <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 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> 161
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-475
 <400> 161

```

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> 162

<211> 439

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-474

<400> 162

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> 163
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-473
 <400> 163

```

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> 164
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-472
 <400> 164

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> 165
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-471
 <400> 165

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> 166
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-470
 <400> 166

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> 167
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-469
 <400> 167

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> 168
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-468
 <400> 168

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> 169
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-466
 <400> 169

```

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> 170
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-465
 <400> 170

```

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> 171
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-464
 <400> 171

```

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
420          425

```

<210> 172
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-462
 <400> 172

```

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

```

ES 2 673 093 T3

```

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
      420      425

```

<210> 173
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-460

<400> 173
 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
 420 425

<210> 174

<211> 423

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-458

<400> 174

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									
			420												

<210> 175
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-456
 <400> 175

```

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
 420

```

<210> 176
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-454
 <400> 176

```

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

```

<210> 177
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-452
 <400> 177

```

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

<210> 178

<211> 415

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-450

<400> 178

```

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
 405      410      415

```

<210> 179
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-508
 <400> 179

```

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
 465      470

```

<210> 180
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-506
 <400> 180

```

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
 465      470

```

<210> 181
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-504
 <400> 181

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
 465

<210> 182

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-502

<400> 182

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
 465

<210> 183
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-500
 <400> 183

```

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> 184
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-498
 <400> 184

```

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> 185
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-496
 <400> 185

```

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> 186
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-494
 <400> 186

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> 187
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-492
 <400> 187

```

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> 188

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 36-488

<400> 188

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> 189
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> PH20 36-486
 <400> 189

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> 190

<211> 2105

<212> ADN

<213> Bos taurus

<220>

<223> ADN de PH20

<400> 190

```

ggtttatctc tgttcttggg gaggagacag acagaattga ctgctgtgct catccgcgag 60
ggtaaatgtg ctcagctctt tatggagtag tggagacggg cagagatgac aagatgaagc 120
aacttgcaaa acattcctaa atacgaagga agaagaatat ttaaatgtaa atcatcatta 180
ttcattttta tccatcaaag tggcttcatt ctgtgttcatt atcttgcac aaatattagg 240
tacaccaaaag cgtgtaggag aaaaaagtgc ctttcacagt catcgctctt tgtgatgaga 300
atgctgaggc gccaccatat ctcccttcgg agctttgctg ggtctagcgg aacacccag 360
gcagtgttca ccttccttct gcttcctgtg tgtttggctc tggacttcag agcaccctct 420
cttatttcaa acacttcttt cctctgggcc tggaaatgcc cagttgaacg ttgtgttaac 480
agaagatttc aactacctcc agatctgaga ctcttctctg taaaaggaag cccccagaaa 540
agtgtctacc gacaatttat tacattatth tctgtctgata gacttggcta ctatcctcat 600
atagatgaaa aaacaggcaa aaccgtattc ggaggaattc cccagttggg aaacttaaaa 660
agtcatatgg agaagcaaaa aaatgacatt gcctattaca taccaaatga cagcgtgggc 720
ttggcgggtca ttgactggga aaactggagg cctacctggg caagaaactg gaaacctaaa 780
gatgtttaca gggatgagtc agttgagttg gttctgcaaa aaaatccgca actcagtttc 840
ccagaggctt ccaagattgc aaaagtggat tttagacag caggaaagag tttcatgcaa 900
gagactttaa aactgggaaa attacttcgg ccaaactact tatgggggta ttatcttttt 960
cctgattggt acaatcataa tcataaccaa cctacttaca atggaaattg ccctgatgta 1020
gaaaaaagga gaaatgatga tctcgagtgg ttgtggaagg aaagcactgc ccttttccct 1080
tctgtttatt tgaatatcag gttaaaatct actcaaatg ctgccttgta tgttcgtaat 1140
cgtgtccagg aagccattcg gttgtctaaa atagcagtg tcgaaagtcc acttccgggt 1200
tttgatatg cccgtccagt ttttactgat gggctctcaa catatctttc tcagggtgac 1260
cttggaatt cggttggtga gatcgtttct ctagggtgcct ctgggattat aatgtggggc 1320
agtctcaatc taagcttatc tatgcaatct tgcatgaacc taggcactta cttgaacact 1380
acactgaatc cttacataat caacgtcacc ctagccgcca aaatgtgcag ccaagtgttt 1440
tgccacaatg aaggagtgtg tacaaggaaa cactggaatt caagcgacta tcttcacctg 1500
aaccacatga attttgctat tcaaaactgg gaaggtggaa aatacacagt acctgggaca 1560
gtcacacttg aagacttgca aaagttttct gatacattht attgcagttg ttatgccaac 1620
atccactgta agaagagagt tgatataaaa aatgttcata gtgttaacgt gtgtatggca 1680
gaagacattt gtatagacag ccctgtgaag ttacaaccca gtgatcattc ctccagccag 1740
gaggcatcta ctaccacct cagcagtatc tcacctcca ctacaactgc cacagtatct 1800
ccatgtactc ctgagaaaaca ctcccctgag tgctcctcaa tcagggtgtc ggaagtcact 1860
cccaacgtca cccaaaaggc gtgtcaaatg gttaaattga agaacatttc ctatcagtca 1920
cctattcaaa atattaaaaa tcaaacaccc tattaaaatt aaattcagta aaaaaaaaaa 1980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2040
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2100
aaaaaa 2105

```

<210> 191
 <211> 1971
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>
 <223> ADN de Hyal1
 <400> 191

```

ttggtgcgcc ttggtgccaga ctttaaggaac agaattcttgc tgatgcctgc acaggccctc 60
gccctgggggt caggaagttt ggagaatgag gcctttcagc cttgaggttt ccctacacct 120
gccctggggct atggcagccc acttgcttcc tgtctgcacc ctgttcctga acttgctcag 180
catgacccaa ggctcccggg accctgtggt ccccaaccag cccttacta ccatctggaa 240
tgccaacacc gagtgggtga tgaagaaaca cggcgtggac gtagacatca gtatctttga 300
tgtgtgtagc aacccggggc agaccttcg cggccctaac atgaccattt tctacagctc 360
ccagctgggt acctaccctt actatacatc tgctggggag cctgtgtttg gtggcctgcc 420
ccagaatgcc agcctgaatg cccacctggc ccgcacattc caggacatcc tggctgccat 480
gcctgagcct cgcttctcag ggctggcagt cattgactgg gaggcattgg gcccgcgctg 540
ggccttcaac tgggacacca aggacattta ccggcagcgc tcacgggcat tggtagacaa 600
gcagcaccca gactggctag ctctcgggt ggaggccgca gctcaggacc agttcgaggg 660
ggctgcagag gagtggatgg caggcaccct caagctggga caagcactgc gccctcaggg 720
cctctggggc tctataaatt tccctgagtg ctacaactat gactttaaaa gtcccaacta 780
tacaggccgg tgtccactaa acatctgtgc ccagaatgac cagctcgggt ggctgtgggg 840
ccagagccgt gccctctacc ccagcatcta cctgcctgca gcaactggag gcacgaagaa 900
gacacagatg ttcgtgcagc accgtgtggc tgaggcattc cgtgtggcag cgggtgcggg 960
ggaccccaag ctgccggtgc tgccctacat gcagctcttc tacgacatga ctaaccactt 1020
tctgcccgcg gaggagctgg agcacagcct gggggagagt gcagcccagg gtgcagcggg 1080
agtgtgctc tgggtgagct ggctgagcac aagcaccaag gaatcatgcc aggccatcaa 1140
ggagtatgtg gacacgacgc tgggaccctc catcctgaat gtgaccagcg gggctcgtct 1200
gtgcagtcag gtccatgctt ccggccatgg ccgttgtgcc cggcgcccca gttaccccaa 1260
ggcccgccct atcctcaact ccaccagttt ttccatcaag cctacacctg gtggtggggc 1320
cctgacccta caaggtgccc tctcgctcga ggatcggttg cggatggcag tggagttcga 1380
atgtcgctgc taccgtgggt ggagggggag acggtgtgag cagtggggca tgtgtgatt 1440
ggcatgggca cgcactgagt acctgatgca agctgggcct ggctatccca 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 ctctctctgg agacactgag 1800
tcagtcttca aacagaagca gtcacaagca ctgacattcg ggacttccct ggccatccag 1860
tggttaagac acggagcttc cactgcaggg ggcacgggca gagactaaga tcacgaatgc 1920
taagcgggtgc ggttaacaa ataacaaata aataaactga cattcactgg g 1971

```

<210> 192

<211> 1912

<212> ADN

<213> Bos taurus

<220>

<223> ADN de Hyal2

<400> 192

```

caagtgcgcc gcgggctgcc caaagggcag gagctggcgc gaatagcttg gctagagact 60
taccgccgga aggagggagg ccgcccacct actgggccga cggactcca cacagttcct 120
gagctggtgc ctggcagggtg acactgactt cctgcagccc ccagcatgtg gacaggcctg 180
ggccccgcgc tcacactggc cctggtgttg gtggtggcat gggccacgga gctgaagccc 240
acagcaccaa ccatcttcac gggccggccc tttgtggtcg catgggatgt gccacacag 300
gactgtggcc cgcgccacaa gatgccattg gacccaaagg acatgaaggc ctttgatgtt 360
caggcttcac ctaacgaggg ttttgtaaat cagaacatca ccatcttcta ccgtgaccgg 420
ctgggcattg atccacactt caattcggtg gggaggtcag tacatggtgg tgtgccacag 480
aatggcagcc tctgggtaca cctggagatg ctgaagggac acgtggaaca ctacattcgt 540
acacaggagc ctgcagggct ggagtcattc gactgggagg actggcggcc agtgtgggtg 600
cgcaactggc aggacaagga tgtgtaccgc cgattatcac gccatttggt agccattcgc 660
caccctgatt ggccaccaga gcgcgtagcc aaggaggcgc agtatgagtt tgagttcgct 720
gcacggcagt tcatgctgga gacattgcga tttgtcaagg cgtttcggcc tcggcaccta 780
tggggcttct acctcttccc tgactgttac aacctgatt atgtgcagaa ctgggagacc 840
tatacaggcc gctgccctga tgttgaggtc tcccgaatg accagctggc ctggctctgg 900
gccgagagca cggccctctt cccctctgtc tacttggaag agacactggc ttcctccact 960

```

ES 2 673 093 T3

cacggccgca	actttgtcag	ctttcgtgtc	caggaggctc	ttcgcgtggc	tgacgtccac	1020
catgccaacc	atgcactccc	cgtctacgtc	ttcacgaggc	ccacctatag	ccgtggactc	1080
acagggctta	gcgagatgga	tctcatctcc	accattgggtg	agagtgtctg	cctgggtgca	1140
gctggcgtca	tcctctgggg	tgacgcaggg	tttaccacca	gcaacgagac	ctgccgacgc	1200
ctcaaggatt	atctgactcg	gtcattggta	ccctatgtcg	tcaatgtgtc	ctgggctgcc	1260
cagtactgca	gctgggcccc	gtgccatggc	catgggcgct	gtgtgcgccg	ggaccccaac	1320
gctcacacct	tcctgcacct	cagtgccagc	agcttccgtc	tagtgcctag	ccacgcacct	1380
gatgagccgc	ggctgcgacc	agagggggaa	ctcagttggg	ccgaccgcaa	ccacctacag	1440
atgcactttc	gctgccagtg	ctacttaggc	tggggcgggtg	agcaatgcca	gtgggaccgc	1500
aggcgggcag	ctgggggtgc	cagtggggcc	tgggctgggt	cccacctcac	tggcctgctg	1560
gcagtggcag	tcctggcctt	cacctagact	ttgtaagggt	ctctcaccca	gctgccacgc	1620
cagctggcct	ctgccacaag	gggtctgtca	ggcatgtagg	agcctgcaag	gggtggacaa	1680
accagagtct	ggaggggcag	agccctctgg	gatgcctggg	aggatgtcct	taccagctcc	1740
cacccctctg	tctaaggggg	aggggcagtc	ccctggaagg	ccccgtctct	ccctgccaga	1800
gaggaagagg	ggcacagctg	ggccggggag	gacctgacct	tactcccctg	cccctggata	1860
gtttattatt	attatttttg	ggtctctttt	gtaaatataa	tataaaacaa	ct	1912

<210> 193
 <211> 1537
 <212> ADN
 <213> Ovis aries

<220>
 <223> ADN de Hyal2

<400> 193						
gcaaatgaca	ctgacttcct	gcagccccc	gcatgtggac	aggcctgggc	cccgcctgca	60
cactggccct	ggtgttggtg	gtggcatggg	ccacagagct	gaagcccaca	gcaccacca	120
tcttcacggg	ccggcccttt	gtggttgcat	gggatgtgcc	cacacaggac	tgtggccca	180
gccacaagat	gccattggac	ccaaaggaca	tgaaggcctt	tgatgtgcag	gcctcaccta	240
acgaggggtt	tgtaaatcag	aacatcacca	tcttctaccg	tgaccggctg	ggcatgtatc	300
cacacttcaa	ctcgggtggg	aggtcagtc	atggtggtgt	gccacagaat	ggcagcctct	360
gggtacacct	ggagatgctg	aagggacacg	tggaaacta	cattcgtaca	caggagcctg	420
cagggtggtg	agtcacgcag	tgggaggact	ggcgccagc	gtgggtgcgc	aactggcagg	480
acaaggatgt	gtaccgccga	ttatcacgcc	agttggtggc	cagtcaccac	cccgaattgg	540
caccagagcg	catagtcaag	gaggcgagc	atgagtttga	gttcgctgca	cggcagttca	600
tgtggagac	actgcgattt	gtcaaggcgt	ttcggcctcg	gcacctatgg	ggcttctacc	660
tcttcctctga	ctgttacaac	catgattatg	tgcaaaactg	ggagacctat	acaggccgct	720
gccctgatgt	tgaggtctcc	cgaaatgacc	agctgtcctg	gctctggggc	gagagcacag	780
ccctcttccc	ctctgtctac	ctggaagaga	cgctggcttc	ctccactcac	ggccgcaact	840
ttgtcagctt	tcgtgtccag	gaggctcttc	gcgtggctga	cgtccaccat	gccaaccatg	900
cactcccag	ctacgtcttc	acgagcccca	cctacagccg	tggactcaca	gggcttagcg	960
agatggatct	catctccacc	attggtgaga	gtgctgccct	gggtgcagcc	ggcgtcatcc	1020
tctgggggtga	cgcagggttt	accaccagca	acgagacctg	ccgacgcctc	aaggattatc	1080
tgactcgggtc	actggtaccc	tatgtcgtca	atgtgtcctg	ggctgcccag	tactgcagct	1140
gggcccagtg	ccatggccat	gggcgtgtg	tgcgcccggg	ccccaacgct	cacaccttcc	1200
tgcacctcag	tgccagcagc	ttccgtctag	tgcctagcca	cgcacctgat	gagcccgggc	1260
tgccagaccaga	gggggagctc	agttgggccc	accgcaacca	cctacagacg	cactttcgct	1320
gccagtgtcta	cttaggctgg	ggcgtgagc	agtgccagtg	ggaccgcagg	cgggcagctg	1380
gggggtgccag	tggggcctgg	gctgggtccc	acctcactgg	cctgctggca	gtggcagctc	1440
tggccttcac	ctggacttcg	taagggtctc	accagctgc	caggccagct	ggcctctgcc	1500
acaaggggtc	tgccaggcat	gtagcagccc	acaagggt			1537

<210> 194
 <211> 1967
 <212> ADN
 <213> Ovis aries

<220>
 <223> ADN de Hialuronidasa
 <400> 194

```

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 aaaaagtgtc tttcatagtc 240
atcgctcttt gtgaagagaa tgctaaggcg ccgcatatc tcttttagga gctttgttgg 300
ggccagtggg acaccccgag cggcgctcgc cttccttctg cttccatgtt ggttggtctc 360
ggacttcaga gcaccccttc 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 atttgaaaa agccaaaaaa gacattgcct attatatacc 660
aaatgacagc gtgggcttgg cggtcattga ctgggaaaac tggaggccta cctgggcaag 720
aaactggaaa cctaaagatg tttaacaggga tgagtctgtt gagttggttc tgcaaaaaaa 780
tccacaactc agtttccag aggcctccaa gattgcaaaa gtggattttg agacagcagg 840
aaagagtttc atgcaagaga ctttaaaact gggaaaatta cttcgcccaa atcacttatg 900
gggttattat ctttttctg attgttaca tcataattat aaccagccta cttacaatgg 960
aaattgctct gatthagaaa aaaggagaaa tgatgatctc gactgggtgt ggaaggaaag 1020
cactgcctt tcccttctg tttattttaa tatcaagtta aaatctactc caaaagctgc 1080
cttctatgtt cgtaatcgtg tccaggaagc cattcggttg tctaaaatag cgagtgttga 1140
aagtcacatt ccggtttttg tatatcaccc tccagttttt actgatgggt cttcaacata 1200
cctttctcag ggtgacctg tgaattcggg ttggtgagatc gttgctctag gtgcctctgg 1260
gattataatg tggggcagtc tcaatctaag cctaactatg caatcttgca tgaacctagg 1320
caattacttg aacactacac tgaatcctta cataatcaac gtcaccctag cagccaaaat 1380
gtgcagccaa gtgctttgcc acgatgaagg agtgtgtaca aggaacaat ggaattcaag 1440
cgactatctt cactgaacc caatgaattt tgctattcaa actgggaaag gtggaaaata 1500
cacagtaact gggaaagtca cacttgaaga cctgcaaacg ttttctgata aattttattg 1560
cagttgttat gccaacatca actgtaaaga gagagttgat ataaaaatg ttcatagtgt 1620
taatgtatgt atggcagaag acatttgtat agagggcctt gtgaagttac aaccagtgta 1680
tcattcctct agccagaatg aggcactcac taccaccgtc agcagtatct caccctctac 1740
tacagccacc acagtatctc catgtactcc tgagaaacag tcccctgagt gcctcaaagt 1800
caggtgtttg gaagccatcg ccaacgtcac ccaaacgggg tgtcaaggtg ttaaatggaa 1860
gaacacttcc agtcagtcaa gtattcaaaa tattaataat caaacaacct attaaaaat 1920
aaattcagtg cttattaaga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1967

```

<210> 195
 <211> 2116
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> HAS1

```

cggagagaag agagagcccc gccagaccca ctgcatgag acagcaggac gcgcccgaagc 60
ccactcctgc agcctgccgc tgctccggcc tggcccgagg ggtgctgacc atcgcttctg 120
ccctgctcat cctgggcctc atgacctggg cctacgccgc cgggggtgcc ctggcctccg 180
atcgctacgg cctcctggcc ttcggcctct acggggcctt cctttcagcg cactgtgtgg 240
cgcagagcct cttcgcttac ctggagcacc ggccgggtggc ggccggcgccg cggggggccg 300
tggatgcagc caccgcgcgc agtgtggcgc tgacctctc cgcctaccag gaggaccccg 360
cgtacctgcg ccagtgcctg gcgtccgccc gcgcctgct gtaccgcgcg gcgcggtgc 420
gcgtcctcat ggtggtggat ggcaaccgca ccgaggacct ctacatggtc gacatgttcc 480
gcgaggtctt cgctgacgag gaccccgcca cgtacgtgtg ggacggcaac taccaccagc 540
cctgggaacc cgcggcgccg ggccggtgg gcgccggagc ctatcgggag gtggaggcgg 600
aggatcctgg gcgctggca gtggaggcgc tggtagggac tgcgaggtgc gtgtgcgtgg 660
cgcagcgctg gggcggcaag cgcgaggtca tgtacacagc cttcaaggcg ctcgagatt 720
cgggtgacta cgtgcaggtc tgtgactcgg acacaaggtt ggaccccatg gcactgctgg 780
agctcgtgcg ggtactggac gaggaccccc gggtaggggc tgttggtggg gacgtgcgga 840
tccttaaccc tctggactcc tgggtcagct tcctaagcag cctgcgatac tgggtagcct 900
tcaatgtgga gcgggcttgt cagagctact tccactgtgt atcctgcatc agcgtcctc 960
taggcctata taggaataac ctcttgacgc agtttcttga ggcctgttac aaccagaagt 1020
tcctgggtac ccactgtact tttgggatg accggcacct caccaaccgc atgtcagca 1080
tgggttatgc taccaagtac acctccaggt cccgctgcta ctcagagacg ccctcgtcct 1140

```

tcctgcggtg	gctgagccag	cagacacgct	ggccaagtc	gtacttccgt	gagtggctgt	1200
acaacgcgct	ctggtggcac	cgccaccatg	cgtggatgac	ctacgaggcg	gtggtctccg	1260
gcctgttccc	cttcttcctg	gcggccactg	tgctgcgtct	gttctacgcg	ggccgccctt	1320
gggcgctgct	gtgggtgctg	ctgtgcgtgc	agggcggtggc	actggccaag	gcgcccttcg	1380
cggcctggct	gcggggctgc	ctgcgcgtgg	tgcttctgtc	gctctacgcg	cccctctaca	1440
tgtgtggcct	cctgcctgcc	aagttcctgg	cgctagtcc	catgaaccag	agtggctggg	1500
gcacctcggt	ccggcggaag	ctggccgcta	actacgtccc	tctgctgccc	ctggcgctct	1560
gggcgctgct	gctgcttggg	ggcctggtcc	gcagcgtagc	acacgaggcc	agggccgact	1620
ggagcgggcc	ttcccgcgca	gccgaggcct	accacttggc	cgcggggggc	ggcgccctacg	1680
tgggctactg	ggtggccatg	ttgacgctgt	actgggtggg	cgtgcggagg	ctttgcccgc	1740
ggcggaaccg	gggctaccgc	gtccaggtgt	gagtcacagc	acgcggatgc	cgcctcaagg	1800
gtcttcaggg	gagccagag	gagagctgct	gggccccgag	ccacgaactt	gctgggtggg	1860
tctctgggcc	tcagtttccc	tcctctgcaa	aacgaggggg	tcagcccaag	attcttcagt	1920
ctggactata	ttgggactgg	gacttctggg	tctccaggga	gggtatttat	tggtcagggt	1980
gtgggatctg	aggagtggag	ggaaagggtc	ctgctttctc	ctogttctta	tttaactctc	2040
atttctactg	tgtgatcagg	atgtaataaa	gaattttatt	tattttcaaa	aaaaaaaaaa	2100
aaaaaaaaaa	aaaaaa					2116

<210> 196

<211> 3275

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HAS2

<400> 196

gaagtcaaga	cgtctggaag	gaattaccca	gtcctggctt	cgagcagccc	attgaaccag	60
agacttgaaa	cagccccagc	caaagacttt	tctcccaatt	ctgcgcttcc	tgggttctgc	120
tgagtcttcc	acaggctttt	tttttttttt	tttttttttt	taagacgaaa	aagagatttt	180
ctgttatcgg	gggcagaaag	actgaagccc	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aagaaaagaa	240
aagaaaaaag	aaaagttaat	ttatttttaa	agcataattt	ttttaagaat	tagactgaag	300
tgcaaccgaa	acataaagag	aatatttagt	aaattatttt	ttaaagtggg	gaagaatcaa	360
acatttaaga	ctccccatc	cttttttaaa	gttgttttta	aatttcttat	tttttttggc	420
cggctgcttc	aaattcatct	gatctcttat	tacctcaatt	ttggaaactg	cccgccaccg	480
accctccggg	accacacaga	caggctgagg	acgactttat	gaccaagagc	tgaacaagat	540
gcattgtgag	aggtttctat	gtatcctgag	aataattgga	accacactct	ttggagtctc	600
tctcctcctt	ggaatcacag	ctgcttatat	tgttggctac	cagtttatcc	aaacggataa	660
ttactatttc	tcttttgagc	tgtatggtgc	ctttttggca	tcacacctca	tcattccaaag	720
cctgtttgcc	tttttgagag	accgaaaaat	gaaaaaatcc	ctagaaaccc	ccataaagtt	780
gaacaaaaca	gttgcccctt	gcatacgctc	ctatcaagaa	gatccagact	acttaaggaa	840
atgttttgcaa	ctgtgaaaaa	ggctaacccta	ccctgggatt	aaagttgtca	tggtcataga	900
tgggaactca	gaagatgacc	tttacctgat	ggacatcttc	agtgaagtca	tgggcagaga	960
caaatacagc	acttatatct	ggaagaacaa	cttccacgaa	aagggtcccg	gtgagacaga	1020
tgagtcacat	aaagaaagct	cgcaacacgt	aacgcaattg	gtcttgtcca	acaaaagtat	1080
ctgcatcatg	caaaaatggg	gtggaaaaag	agaagtcagc	tacacagcct	tcagagcact	1140
gggacgaagt	gtggattatg	tacaggtttg	tgattcagac	actatgcttg	acccagcctc	1200
atctgtggag	atggtaaaag	ttttagaaga	agatcccatg	gttggaggtg	ttgggggaga	1260
tgtccagatt	ttaaacaagt	acgattcctg	gatctcattc	ctcagcagtg	taagatattg	1320
gatggctttt	aatatagaaa	gggcctgtca	gtcttatttt	gggtgtgttc	agtgcattag	1380
tggacctctg	ggaatgtaca	gaaactcctt	gttgcagtag	tttgtggaag	attggtacaa	1440
tcaagaattt	atgggcaacc	aatgtagctt	tggatgatgc	aggcatctca	cgaaccgggt	1500
gctgagcctg	ggctatgcaa	caaaatacac	agctcgatct	aagtcgctta	ctgaaacacc	1560
tatagaatat	ctcagatggc	taaaccagca	gaccggttgg	agcaagtcct	acttccgaga	1620
atggctgtac	aatgcaatgt	ggtttcacaa	acatcacctg	tggatgacct	acgaagcgat	1680
tatcactgga	ttctttcctt	tctttctcat	tgccacagta	atccagctct	tctaccgggg	1740
taaaatttgg	aacattctcc	tcttcttggt	aactgtccag	ctagtaggtc	tcataaaatc	1800
atcttttgcc	agctgcctta	gaggaaatat	cgtcatgggt	ttcatgtctc	tctactcagt	1860
gttatacatg	tcgagtttac	ttcccgcctc	gatgtttgca	attgcaacaa	taaacaagc	1920
tgggtggggc	acatcaggaa	ggaaaaccat	tgttggtta	ttcataggac	tcattccagt	1980
atcagtttgg	tttacaatcc	tctgtgggtg	tgtgattttc	accatttata	aggagtctaa	2040
aaggccattt	tcagaatcca	aacagacagt	tctaattgtt	ggaacgttgc	tctatgcagc	2100
ctattgggtc	atgcttttga	cgctgtatgt	agttctcatc	aataagtggt	gcaggcgga	2160

gaagggacaa	caatatgaca	tggtgcttga	tgtatgatct	tccatgtttt	gacgttttga	2220
gtcacacaca	acaccttagt	tctcttaggg	gctgtacagt	attgtggcat	cagataatgc	2280
caccaaagga	gacatatcac	tgctgctggg	acttgaacaa	agacatttat	atgggtttat	2340
tttcattctg	ccaaagtaaa	acaatacatc	aacaagaaga	aactcagatt	taacctgtta	2400
tttctatgaa	aatgggatga	attccttggt	tatgcacttt	ttccttactg	tgcatccgcc	2460
tgaaagtgtt	ttgccctata	tacctcacta	gccatgcttt	atgtgggtta	tcattggaaga	2520
aaaggatttt	ggaaactcaa	ggaaaagttc	tttcaacctt	tacaacctaa	cttatggact	2580
gttttgatag	atgataattt	ttttttttta	ggaaggattt	tcttttttaac	tttaccaaat	2640
gaaatgccaa	aggaagtgtt	aaaggccgtt	ggctgtgctg	tattttgata	taattgtact	2700
gtgtttttta	attttgatat	ccaatcttaa	agacaaattt	tgcatattct	ctattttact	2760
tttctgccaa	aataaacctg	ttcttccttt	tttaaaataa	aataagtctt	taaaaaattt	2820
atacttaaaa	aatcctgccc	aaaatgtgaa	gcttgggtga	ctgatgttca	tgatagaaag	2880
aataaaatgt	ttctctctct	ctacctttta	aaattgaata	gtttatttct	gtgaaagaag	2940
tattttaaact	ttcaatatatt	taactttttg	tttttatttc	ttttagaaaa	ggccaatata	3000
cctatcacac	tttgggaagta	aaaatacaca	ctttcgtgtg	tacctaaaaa	aaaaatcggt	3060
gaaaaatcaag	gccaaaggta	gtgcaatttt	ttcatthaaga	tttaaaaaaa	agggaatgat	3120
agtctttgaa	agaaaacagt	aggcatccag	cactggacaa	aacatgggtg	tcaaagatga	3180
ataatctttg	gagattcttg	cagtgttttc	ccagaacaag	tcaagtggaa	agtggagaaa	3240
ttatctgtat	aattttggac	acatacaaat	cagtt			3275

<210> 197

<211> 4220

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> variante 1 del transcrito de HAS3

<400> 197

gagtgcgttc	gcgctgctt	tgacctggtg	ggcgccgcct	ccggcactgc	accgaggcgg	60
ggcgccagcg	cccaggttgc	tggtgctggc	ttggcgcccc	cttcccctac	ccagagcgca	120
ggcaggcagg	gggtgccgcg	cgcgccctt	cagcatatgc	cgggtgcagct	gacgacagcc	180
ctgctgtggt	tgggcaccag	cctgtttgcc	ctggcagtg	tggtggcat	cctggcagcc	240
tatgtgacgg	gctaccagtt	catccacacg	gaaaagcact	acctgtcctt	cgccctgtac	300
ggcgccatcc	tgggcctgca	cctgctcatt	cagagccctt	ttgccttcct	ggagcaccgg	360
cgcctgagc	gtgcccggca	ggccctgaag	ctgcccctcc	cgccggcggg	ctcggtggca	420
ctgtgcattg	ccgcatacca	ggagaccct	gactacttgc	gcaagtgcct	gcgctcggcc	480
cagcgcatct	ccttccctga	cctcaagggtg	gtcatgggtg	tggtatggcaa	ccgccaggag	540
gacgcctaca	tgctggacat	cttccacgag	gtgctggg	gcaccgagca	ggccggcttc	600
tttgtgtggc	gcagcaactt	ccatgaggca	ggcgagggtg	agacggaggc	cagcctgcag	660
gagggcatgg	accgtgtg	ggatgtggtg	cgggccagca	ccttctcgtg	catcatgcag	720
aagtggggag	gcaagcgcg	ggtcatgtac	acggccttca	aggccctcgg	cgattcggtg	780
gactacatcc	aggtgtgcga	ctctgacact	gtgctggatc	cagcctgcac	catcgagatg	840
cttcgagtc	tgaggaggga	tcccacaagta	gggggagtcg	ggggagatgt	ccagatcctc	900
aacaagtacg	actcatggat	ttccttctctg	agcagcgtgc	ggtactggat	ggccttcaac	960
gtggagcggg	cctgccagtc	ctactttggc	tgtgtgcagt	gtattagtgg	gcccttgggc	1020
atgtaccgca	acagcctcct	ccagcagttc	ctggaggact	ggtaccatca	gaagttccta	1080
ggcagcaagt	gcagcttcgg	ggatgaccgg	cacctcacca	accgagtcct	gagccttggc	1140
taccgaacta	agtataccgc	gcgctccaag	tgctccacag	agacccccac	taagtacctc	1200
cgggtggtca	accagcaaac	ccgctggagc	aagtcttact	tccgggagtg	gctctacaac	1260
tctctgtggt	tccataagca	ccacctctgg	atgacctacg	agtcagtggt	cacgggtttc	1320
ttccccttct	tcctcattgc	cacggttata	cagcttttct	accggggccg	catctggaac	1380
attctcctct	tcctgctgac	ggtgcagctg	gtgggcatta	tcaaggccac	ctacgcctgc	1440
ttccttcggg	gcaatgcaga	gatgatcttc	atgtccctct	actccctcct	ctatatgtcc	1500
agccttctgc	cggccaagat	ctttgccatt	gctaccatca	acaaatctgg	ctggggcacc	1560
tctggccgaa	aaaccattgt	ggtgaacttc	attggcctca	ttcctgtgtc	catctgggtg	1620
gcagttctcc	tgggagggtc	ggcctacaca	gcttattgcc	aggacctgtt	cagtgcagaca	1680
gagctagcct	tccttgtctc	tggtgctata	ctgtatggct	gctactgggt	ggccctcctc	1740
atgctatatc	tgccatcat	cgcccgccga	tgtgggaaga	agccggagca	gtacagcttg	1800
gcttttctgt	aggtgtgaca	tggtccccc	gcagagcggg	taaagtgc	tggttaagg	1860
agggaagg	aatgggaag	aaaagacagg	gtgggaggga	ggagggagtg	ctgtgtttta	1920
gtctctta	ggtccaaagg	acaaatctaa	aatgcgaaga	acggtgatgt	agtatggcct	1980
gacagctctg	tttagaggag	gcaacactga	tccccagat	gcagggtctgc	aggggattct	2040

```

gtgttttcag actgcctgtc tgcttgcatc tgcacatagg cagtagcctc ctcctgggct 2100
ccagagggca ctcagaagtt gtgctaaacc aagttaagtc ccattcagtg gcaacttggt 2160
ataggtacct gagtgcgggc aacctgcgga aggagggtct cccagcccat ctgaacacaa 2220
ccagagggtg caggagaatt tctactgagc gagctgggccc ggtagtgta tgtcaccccc 2280
accccacccc taagtagtca tcaatgcaat aagattgcgc ctgagatata agggccagaa 2340
gcctgatctt tgggcatcag aaaacagggt ccaggaatgg tgctttatgt gagatacccc 2400
actccacatc aacattccag ggatgagcca aaccagcagg gagttagcac tgaactgctt 2460
ttaaaagtgc acattaaaaa ggaaagtttg ccaggaggaa caaagagatt gtggtggtgc 2520
taaaggaggc cataagctac acagaggcct tgggtgttcc acctggaac tgctcagacg 2580
tctagatggg ttcttagctt gtctgtgac tctgctgggg agataaaaag attaaagccc 2640
aacatgttca gaaaagaagt gaagtcttgg gtattttaac ctgtatactc ttgaattcct 2700
ctcaaattca gctctgatct gaggctaaga cactctccc acttcacttt cttcaaagcc 2760
acattttttg aggtatcact gcagtcacct cttctacct catcatcata ggtaagggtt 2820
tcaagggtgc aattggggcg gagccccggc tcttatagaa gcttcagcag gaggcaagcg 2880
tgttctcagc acatatggga actatgagga gcctctgatc aaattggcta caatcttggg 2940
gctgcttggg cggattcctt ggcagccggg ttagcatgtg tgactttcag gctactgttc 3000
ttgacaatca tctccaatgg aaagcttttc agtgttccca aagtgaactc tcaaatccaa 3060
aatggttatc tttgagacca tccattctcc tcagtggctt ctcaggggaa ttcttacagc 3120
caagttgtga cagtcactgc atttgcctgc ttctttccag aaaccaaact aggagatgaa 3180
actggttctc actccctaag gttcttgctt tctctctcat gcctcctgag gctgtttttg 3240
gctgttttcc ctctgctgct tttggggaat gaggggaagc cattttccag tgacttgcaa 3300
tccaggtctg tctcagcgtt ttgagtttaa aacctgggat cctgactaag cctttgactt 3360
aagggttgct tgcttgccct ccaaagtgtc tttctcagag gggccagcta acccgtgcag 3420
aaccagcact aaggtggaca gcagacaaga gggcaagcct ctagtgtacc aagtgttcc 3480
tacaagacg caaggtgtgc tctgagccac agatgggcaa accctggtgc tttccttcat 3540
ctcccacgaa ctcaagggtt ttccaggtgt agctaacagt tgccacatca cacagacctc 3600
gagtttctgg taagactgct ggttgacatc agaccaacc catgaaggct ggaaggcagc 3660
aggcatttgc taaggcagct gatccaggca atcgttctgc tggccaagaa gttaaactat 3720
tttgagcatt agaattggag aaatccggtc agccaagtgc agagttcaga cttcgctaag 3780
ggcttggttt tcttcagcat ttacttgaag attaatgtag gatgacaggc tctcctggct 3840
gtcctaccat cagctctgcc ttgactgtg gtctcaact ttcctcaaat caaaaacagg 3900
caggtagcag tagtgggctc acaactgttg acctcgactg gtttttctaa gttattttgt 3960
acatttttca gcagcaaaac caaactgggt cttcagcttt atccccgttt cttgcaaggg 4020
aagagccttt atacaattgg acgcattttg gtttttctc attgagaatt caaatctctc 4080
tttgatttgt ttctacaata atttgtaaac atatttattt ttacctgctt tttttttttt 4140
ttttaatttt caggtcaagt tttttatact gcacttattt gtcaaaaata agattctcac 4200
atatgccggt tatctcgaaa 4220

```

<210> 198
 <211> 1229
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> variante 2 del transcrito de HAS3

```

<400> 198
ggaggggcat ggagccgccc cgggcctgct gagctccgga gcgcggcagc cggcggcacg 60
atgccggtgc agctgacgac agccctgcgt gtggtgggca ccagcctgtt tgccctggca 120
gtgctgggtg gcatcctggc agcctatgtg acgggctacc agttcatcca cacggaaaag 180
cactacctgt ccttcggcct gtacggcgcc atcctgggcc tgcacctgct cattcagagc 240
ctttttgcct tcttgagaca ccggcgcatg cgacgtgccc gccaggccct gaagctgccc 300
tccccgcggc ggggctcggt ggcactgtgc attgccgcat accaggagga ccctgactac 360
ttgcgcaagt gcctgcgctc ggcccagcgc atctccttcc ctgacctcaa ggtggtcatg 420
gtggtggatg gcaaccgccg ggaggacgcc tacatgctgg acatcttcca cgaggtgctg 480
ggcggcaccc agcaggccgg cttctttgtg tggcgagca acttccatga ggcaggcgag 540
ggtagagacc agggcagcct gcaggagggc atggaccgtg tgcgggatgt ggtgcgggccc 600
agcaccttct cgtgcatcat gcagaagtgg ggaggcaagc gcgaggtcat gtacacggcc 660
ttcaaggccc tcggcgattc ggtggactac atccaggtgt gcgactctga cactgtgctg 720
gatccagcct gcaccatcga gatgcttcga gtctggagg aggatcccca agtaggggga 780
gtcgggggag atgtccagcc cccagggaaa ggtatggcag tagaggatga ccaggtccaa 840
gctgcccgag tcagagctac ggaagcatgg tccgttcacc aacgccacgt ttctagagag 900
cagtgcgctg attctccaat ggtgagcagg ggactacatg tgaactggga cctgcaggcc 960

```



```

aatgtatccc tgaggaaaag tccacaagaa caattcaaga aactagtaag aaacaatggg 1020
cagaaagctg tgggacgaaa gcacagcagg cttctgggag gctggagatc ctttctctca 1080
agggcaggat tattcccacc tgccacagtt cacatgccac aaataacatc tcaccttcag 1140
tcaagaaaaa cgcaaaggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

<210> 199
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Pan troglodyte

<220>
 <223> PH20 precursor de chimpancé XP_527873

<400> 199

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> 200

<211> 474

<212> PRT

<213> Pan troglodyte

<220>

<223> PH20 madura de chimpancé XP_527873

<400> 200

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> 201

<211> 477

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<220>

<223> PH20 madura de mono Rhesus EHH17639

<400> 201

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> 202

<211> 475

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<223> PH20 madura de mono Cynomolgus P38568.1

<400> 202

```

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> 203

<211> 518

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> PH20 madura de vaca

<400> 203

```

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
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
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
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
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
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 Gln Thr Thr Tyr		
515		

<210> 204

<211> 439

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> PH20 madura de vaca AAP55713

<400> 204

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> 205

<211> 477

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> PH20 madura de ratón NP_001073344.1

<400> 205

```

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> 206

<211> 477

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> PH20 madura de rata NP_446419.1

<400> 206


```

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 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> 207

<211> 510

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<220>

<223> PH20 madura de conejo NP_001076141.1

<400> 207

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> 208

<211> 494

<212> PRT

<213> Cavia porcellus

<220>

<223> PH20 madura de cobaya NP_001166492.1

5

<400> 208

```

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 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> 209
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Vulpes vulpes

5

<220>
 <223> PH20 precursora de zorro rojo

<400> 209
 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

10

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> 210

<211> 505

<212> PRT

<213> Vulpes vulpes

<220>

<223> PH20 madura de zorro rojo Q29152

<400> 210

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> 211

<211> 585

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Albúmina de suero humano (aa 25-609)

<400> 211

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

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

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 212
<211> 1662
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ADNc de variante 1 de HAS3

<400> 212
atgccgggtgc agctgacgac agccctgcgt gtggtgggca ccagcctgtt tggcctggca 60
gtgctgggtg gcatcctggc agcctatgtg acgggctacc agttcatcca caccgaaaag 120
cactacctgt ccttcggcct gtacggcgcc atcctgggcc tgcacctgct cattcagagc 180
ctgtttgctt tcctggagca ccggcgcatg cgacgtgccg gccaggccct gaagctgccc 240
tccccgcggc ggggctcggg ggcactgtgc attgccgcat accaggagga ccctgactac 300
ttgcgcaagt gcctgcgctc ggcccagcgc atctccttcc ctgacctcaa ggtggtcatg 360
gtggtggatg gcaaccgcca ggaggacgcc tacatgctgg acatcttcca cgaggtgctg 420
ggcggcaccg agcaggccgg cttctttgtg tggcgagca acttccatga ggcaggcgag 480
ggtgagacgg aggccagcct gcaggagggc atggaccgtg tgcgggatgt ggtgcggggc 540
agcaccttct cgtgcatcat gcagaagtgg ggaggaagc gcgaggtcat gtacacggcc 600
ttcaaggccc tcggcgattc ggtggactac atccagggtg gcgactctga cactgtgctg 660
gatccagcct gcaccatcga gatgcttcca gtctggagg aggatcccca agtaggggga 720
gtcgggggag atgtccagat cctcaacaag tacgactcat ggatttcctt cctgagcagc 780
gtgcggtact ggatggcctt caacgtggag cgggcctgcc agtcctactt tggctgtgtg 840
cagtgtatta gtgggcccctt gggcatgtac cgcaacagcc tcctccagca gttcctggag 900
gactggtacc atcagaagtt cctaggcagc aagtgcagct tcggggatga ccggcacctc 960
accaaccgag tcctgagcct tggctaccga actaagtata ccgcgcgctc caagtgcctc 1020
acagagaccc ccactaagta cctccggtgg ctcaaccagc aaaccgcgtg gagcaagtct 1080
tacttccggg agtggctcta caactctctg tggttccata agcaccacct ctggatgacc 1140
tacgagtcag tggtcacggg tttcttcccc ttcttcctca ttgccacggt tatacagctt 1200
ttctaccggg gccgcactct gaacattctc ctcttcctgc tgacgggtga gctggtgggc 1260
attatcaagg ccacctacgc ctgcttcctt cggggcaatg cagagatgat cttcatgtcc 1320
ctctactccc tcctctatat gtccagcctt ctgccggcca agatctttgc cattgctacc 1380
atcaacaaat ctggtctggg cactctctgc cgaaaaacca ttgtggtgaa cttcattggc 1440
ctcattcctg tgtccatctg ggtggcagtt ctctggggag ggctggccta cacagcttat 1500
tgccaggacc tgttcagtga gacagagcta gccttccttg tctctggggc tatactgtat 1560
ggctgctact ggggtggcct cctcatgcta tatctggcca tcatcgcccg gcgatgtggg 1620
aagaagccgg agcagtacag cttggccttt gctgaggtgt ag 1662

<210> 213
<211> 10836
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vector pLV-EF1a-hHAS3-IRES-Hyg

<400> 213
aagcttaatg tagtcttatg caatactctt gtagtcttgc aacatggtaa cgatgagtta 60
gcaacatgcc ttacaaggag agaaaaagca ccgtgcatgc cgattggtgg aagtaagggtg 120
gtacgatcgt gccttattag gaaggcaaca gacgggtctg acatggattg gacgaaccac 180
tgaattgccg cattgcagag atattgtatt taagtgccta gctcgatata taaacgggtc 240


```

tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagggga acccactgct 300
taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaaatct ctgacagtg 420
cgcccgaaac gggacttgaa agcgaagggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
cggttgcgtg aagcgcgcac ggcaagaggc gagggcgggc gactgggtgag tacgccaaaa 540
atthtgacta gcgagggcta gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg 600
gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cggttaaggc caggggggaaa gaaaaaatat 660
aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgagc taatcctggc 720
ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
caaaggatag agataaaaaga caccaaggaa gcttttagaca agatagaggga agagcaaaac 900
aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
gaggggacaat tgggaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaaattg aaccattagg 1020
agtagcaccac accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
aggagctttg ttccttgggt tcttggggagc agcagggaagc actatgggagc cagcgtcaat 1140
gacagctgagc gtacaggcca gacaattatt gtctgggata gtgcagcagc agaacaattt 1200
gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
gctccaggca agaactcctg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tccctggggat 1320
ttgggggttg tctgaaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagtgggag 1380
taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcacctgg atggagtggg acagagaaat 1440
taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaaacc agcaagaaaa 1500
gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
aacaatttgg ctgtgtgtata taaaattatt cataatgata gtaggaggtc tggtaggttt 1620
aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
atcgcttacc acccaccctc caaccctgag gggaccgac aggcccgag gaatagaaga 1740
agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctgcagcgta 1800
tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tggggggtac agtgcaaggg aaagaatagt 1860
agacataata gcaacacaga taaaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaattcaa 1920
aattttatcg atgcctcccc gtccaccacc cccccaaccc gccccgaccg gagctgagag 1980
taattcatac aaaaggactc gccctgcctt tggggaaatc cagggaaccgt cgttaaacct 2040
ccactaacgt agaaccacga gatcgctgagc ttcccgcctc ctcaccgccc cgtctctgctc 2100
atcactgagc tctgaaagag catcggtgag gctccggtgc ccgtcagtg gacagcgca 2160
catcgccac agtccccgag aagttggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga 2220
gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagt atgtcgtgta ctggctccgc cttttcccg 2280
agggtggggg agaaccgtat ataagtgcag tagtcgctg gaacgttctt tttcgcaacg 2340
ggtttgccgc tttgctgccc gtaagtgcg tgtgtggttc ccgcgggcct ggctcttta 2400
cgggttatgg cccttgcgtg ccttgaatta cttccacgccc cctggctgca gtacgtgatt 2460
cttgatcccg agcttcgggt tggaaagtgg tgggagagtt cgaggccttg cgttaagga 2520
gccctctcgc ctcgtgcttg agttgagggc tggcctgggc gctggggccc cgcgtgcga 2580
atctgtgagc accttcgcgc ctgtctgct gctttcgata agtctctagc catttaaaat 2640
ttttgatgat atcctgcgac gctttttttc tggcaagata gtcttgtaaa tgcggggcaa 2700
gatctgcaca ctggtatttc ggtttttggg gccgcgggag gcgacggggc ccgtgcgtcc 2760
cagcgacacat gttcggcgag gcggggcctg cgagcgcggc caccgagaat cggacggggg 2820
tagtctcaag ctggccggcc tgctctggtg cctggcctcg cgcccgccgt gagcggaag atggccgctt 2940
ccctgggagg caaggtggc ccggtcgga ccagttcggt gagcggaag gctcggaag gcgggagggt 3000
cccggccctg ctgcaggag ctcaaatgg aggcagcggc cgtcctcag ccgtcgcttc atgtgactcc 3060
gagtcaccca cacaaaggaa aagggccttt cgtcctcag cgagcttttg gactacgtc 3120
acggagtacc ggggcgcgtc caggcacctc gattagttct cgagcttttg gactacgtc 3180
tctttaggtt ggggggaggg gttttatgag atggagtttc cccacactga gtgggtggag 3240
actgaagtta ggccagcttg gcacttgatg taattctcct tgggaatttg cctttttgag 3300
tttgatctt ggttcattct caagcctcag acagtgttcc aaagtttttt tcttccattt 3360
caggtgtcgt gaaaaactacc cctctagacc cgggccacca tgccggtgca gctgacgaca 3420
gccctgcgtg tgggtggcac cagcctgttt gccctggcag tgctgggtgg catcctggca 3480
gcctatgtga cgggctacca gttcatccac acggaaaagc actacctgc cttcgccctg 3540
tacggcgcca tcctgggcct gcactgctc attcagagcc tgtttgcctt cctggagcac 3600
cggcgcatgc gacgtgccg ccagccctc aagctgccct ccccgcgccg ggtcgtcg 3660
gactgtgca ttgcccata ccaggaggac cctgactact tgcgcaagtg cctgcgtcg 3720
gccagcgca tctccttccc tgacctcaag gtggtcatgg tgggtgagtg caaccgccag 3780
gaggacgcct acatgctgga catctccac gaggtgctgg gcggcaccga gcaggccggc 3840
ttctttgtg ggcgcagcaa cttccatgag gcaggcgagg gtgagacgga gccagcctg 3900
caggagggca tggaccgtgt gcgggatgtg gtgcgggcca gcacctctc gtgcatcatg 3960
cagaagtggg gaggcaagcg cgaggtcatg tacacggcct tcaaggccct cggcgattcg 4020
gtggactaca tccaggtgtg cgactctgac actgtgctgg atccagcctg

```

atgcttcgag	tcctggagga	ggatcccca	gtagggggag	tcgggggaga	tgtccagatc	4080
ctcaacaagt	acgactcatg	gatttccttc	ctgagcagcg	tgcggtactg	gatggccttc	4140
aacgtggagc	gggcctgcc	gtcctacttt	ggctgtgtgc	agtgtattag	tgggcccctt	4200
ggcatgtacc	gcaacagcct	cctccagcag	ttcctggagg	actggtacca	tcagaagttc	4260
ctaggcagca	agtgcagctt	cggggatgac	cggcacctca	ccaaccgagt	cctgagcctt	4320
ggctaccgaa	ctaagtatac	cgcgcgctcc	aagtgcctca	cagagacccc	cactaagtac	4380
ctccgggtggc	tcaaccagca	aacccgctgg	agcaagtctt	acttccggga	gtggctctac	4440
aactctctgt	ggttccataa	gcaccacctc	tggatgacct	acgagtcagt	ggtcacgggt	4500
ttcttcccct	tcttctcat	tgccacgggt	atacagcttt	tctaccgggg	ccgcatctgg	4560
aacattctcc	tcttctgtct	gacggtgcag	ctgggtggca	ttatcaaggc	cacctacgcc	4620
tgcttccctc	ggggcaatgc	agagatgac	ttcatgtccc	tctactccct	cctctatatg	4680
tccagccttc	tgccggccaa	gatctttgcc	attgctacca	tcaacaaatc	tggctggggc	4740
acctctggcc	gaaaaacccat	tgtggtgaa	ttcattggcc	tcaattcctgt	gtccatctgg	4800
gtggcagttc	tcctgggagg	gctggcctac	acagcttatt	gccaggacct	gttcagtgag	4860
acagagctag	ccttctctgt	ctctggggct	atactgtatg	gctgctactg	gggtggccctc	4920
ctcatctgtg	atctggccat	catcgcccg	cgatgtggga	agaagccgga	gcagtacagc	4980
ttggcttttt	ctgaggtgta	gacgcgtctc	cggcctagg	ataacagggt	aatccgcta	5040
cccctctccc	tcccccccc	ctaacgttac	tggccgaagc	cgttggaat	aaggccggtg	5100
tgcgtttgtc	tatatgttat	tttccaccat	attgcccgtc	tttggcaatg	tgagggcccg	5160
gaaacccctg	cctgtcttct	tgacgagcat	tcttaggggt	ctttcccctc	tcgccaagg	5220
aatgcaaggt	ctgttgaatg	tcgtgaagga	agcagttcct	ctggaagctt	cttgaagaca	5280
aacaacgtct	gtagcgaccc	tttgaggcca	gcggaacccc	ccacctggcg	acaggtgcct	5340
ctgcggccaa	aagccacgtg	tataagatac	acctgcaag	gcggcacaa	cccagtgcca	5400
cgttgtgagt	tggatagttg	tggaaaagag	caaattggctc	tctcaagcg	tattcaaca	5460
gggctggaag	gatgcccaga	aggtacccca	ttgtatggga	tctgatctgg	ggcctcggt	5520
cacatgcttt	acatgtgttt	agtcgaggtt	aaaaaaacgt	ctaggccccc	cgaaccacgg	5580
ggacgtggtt	ttcctttgaa	aaacacgatg	ataatatggc	cacactagag	atcccaccggt	5640
cgcacccatg	aaaaagcctg	aactcacccg	gacgtctgtc	gagaagtttc	tgatcgaaaa	5700
gttcgacagc	gtctccgacc	tgatgcagct	ctcggaaggc	gaagaatctc	gtgctttcag	5760
cttcgatgta	ggaggcgctg	gatatgtcct	gcgggtaaat	agctgcgcgc	atggtttcta	5820
caaagatcgt	tatgtttatc	ggcactttgc	atcgcccgcg	ctcccgatcc	cgggaagtgc	5880
tgacattggg	atgttcagcg	agagcctgac	ctattgcatc	tcccgcgctg	cacagggtgc	5940
cacgttgcaa	gacctgcctg	aaaccgaact	gcccgcgtgt	ctgcagccgg	tcgcgagggc	6000
catggatgcg	atcgctgcgc	ccgatcttag	ccagacgagc	gggttcggcc	cattcggacc	6060
gcaaggaatc	ggtaataaca	ctacatggcg	tgatttcata	tgcgcgattg	ctgatcccca	6120
tgtgtatcct	atggaacacg	tgatggacga	caccgtcagt	gcgtccgtcg	cgcagcctct	6180
cgatgagctg	atgctttggg	ccgaggactg	ccccgaagtc	cggcacctcg	tgcaacggga	6240
tttcggctcc	aacaatgtcc	tgacggacaa	tggccgcata	acagcggta	ttgactggag	6300
cgaaggcagc	ttcgggggatt	cccaatacga	ggtcgccaac	atcttctctc	ggaggccgtg	6360
ggttgcttgt	atggagcagc	agacgcgcta	cttcgagcgg	aggcatccgg	agcttgacag	6420
atcgcccgcg	ctccgggctg	atatgctccg	catttgtctt	gaccaactct	atcagagctt	6480
ggttgacggc	aatttcgatg	atgcagcttg	ggcgaggggt	cgatgcgacg	caatcgtccg	6540
atccggagcc	gggactgtcg	ggcgtacaca	aatcgcccg	agaagcgcg	ccgtctggac	6600
cgatggctgt	gtagaagtac	tcgcccgatag	tggaaaaccga	cgccccagca	ctcgtccgag	6660
ggcaaaaggaa	taggcggccg	cgtcgacaat	caacctctgg	attacaaaat	ttgtgaaaga	6720
ttgactggta	ttcttaacta	tgttgtcctc	tttacgctat	gtggatacgc	tgctttaatg	6780
cctttgtatc	atgctattgc	ttcccgtatg	gctttcattt	tctcctcctt	gtataaatcc	6840
tgggtgtctg	ctctttatga	ggagttgtgg	cccgttgtca	ggcaacgtgg	cgtggtgtgc	6900
actgtgtttg	ctgacgcaac	ccccactgg	tggggcattg	ccaccacctg	tcagctcctt	6960
tccgggactt	tcgctttccc	cctccctatt	gccacggcgg	aactcatcgc	cgcctgcctt	7020
gcccgcgtct	ggacaggggc	tcggctgttg	ggcactgaca	attccgtgg	gttgctgggg	7080
aagctgacgt	cctttccatg	gctgctcgcc	tgtgttgcca	cctggattct	gcgcgggacg	7140
tccttctgct	acgtcccttc	ggccctcaat	ccagcggacc	ttccttccc	cggcctgctg	7200
ccggctctgc	ggcctcttcc	gcgtcttcgc	cttcgccttc	agacgagtcg	gatctccctt	7260
tgggcgcgct	ccccgcctgg	aattcgagct	cggtagcttt	aagaccaatg	acttacaagg	7320
cagctgtaga	tcttagccac	tttttaaaa	aaaaggggg	actggaagg	ctaattcact	7380
cccaacgaag	acaagatctg	ctttttgctt	gtactgggtc	tctctggtta	gaccagatct	7440
gagcctggga	gctctctggc	taactaggga	accactgct	taagcctcaa	taaagcttgc	7500
cttgagtgtc	tcaagtagtg	tgtgcccgtc	tgttgtgtga	ctctggtaac	tagagatccc	7560
tcagaccctt	ttagttagtg	tggaaaatct	ctagcagtag	tagttcatgt	catcttatta	7620
ttcagtattt	ataacttgca	aagaaatgaa	tatcagagag	tgagaggaa	ttgtttattg	7680
cagcttataa	tggttacaaa	taaagcaata	gcatacaaaa	tttcacaaat	aaagcatttt	7740
tttactgca	ttctagtgtg	ggtttgtcca	aactcatcaa	tgtatcttat	catgtctggc	7800

tctagctatc	ccgcccctaa	ctccgcccac	cccgcacct	actccgccc	gttccgccc	7860
ttctccgccc	catggctgac	taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	ccgcctcgcc	7920
ctctgagcta	ttccagaagt	agtgaggagg	cttttttgga	ggcctaggga	cgtacccaat	7980
tcgcctata	gtgagtcgta	ttacgcgcgc	tactggccg	tcgttttaca	acgtcgtgac	8040
tgggaaaacc	ctggcggttac	ccaacttaac	cgcttgacag	cacatcccc	tttcgccagc	8100
tggcgtaata	gcgaagaggc	ccgcaccgat	cgcccttccc	aacagttgag	cagcctgaat	8160
ggcgaatggg	acgcgcctg	tagcggcgca	ttaagcgcg	cgggtgtggt	ggttacgcgc	8220
agcgtgaccg	ctacacttgc	cagcgcccta	gcgcgcgctc	ctttcgcttt	cttcccttcc	8280
tttctcgcca	cgctcgccgg	ctttccccgt	caagctctaa	atcgggggct	ccctttaggg	8340
ttccgattta	gtgcttttacg	gcacctcgac	cccaaaaaac	ttgattaggg	tgatggttca	8400
cgtagtgggc	catcgccctg	atagacggtt	tttcgccctt	tgacgttgga	gtccacgttc	8460
tttaaatagt	gactcttggt	ccaaactgga	acaacactca	accctatctc	ggtctattct	8520
tttgatttat	aagggaattt	gccgatttcg	gcctattggt	taaaaaatga	gctgatttaa	8580
caaaaattta	acgcgaattt	taacaaaata	ttaacgctta	caatttaggt	ggcacttttc	8640
ggggaatgt	gcgcggaacc	cctatttggt	tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	8700
cgctcatgag	acaataaccc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatga	8760
gtattcaaca	tttcggtgtc	gcccttattc	ccttttttgc	ggcattttgc	cttcctgttt	8820
ttgctcacc	agaaacgctg	gtgaaagtaa	aagatgctga	agatcagttg	ggtgcacgag	8880
tgggttacat	cgaactggat	ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtttt	cgcctcgaag	8940
aacgttttcc	aatgatgagc	acttttaaa	ttctgctatg	tggcgcggtg	ttatcccgta	9000
ttgacgcgg	gcaagagcaa	ctcggtcgcc	gcatacacta	ttctcagaat	gacttggttg	9060
agtactcacc	agtacagaa	aagcatctta	cgatggcat	gacagtaaga	gaattatgca	9120
gtgctgccat	aaccatgagt	gataaactg	cgccaactt	acttctgaca	acgatcggag	9180
gaccgaagga	gctaaccgct	tttttgacac	acatggggga	tcagttaact	cgccttgatc	9240
gttggaac	ggagctgaat	gaagccatac	caaacgacga	gcgtgacacc	acgatgcctg	9300
tagcaatggc	aacaacgttg	cgcaaaactat	taactggcga	actacttact	ctagcttccc	9360
ggcaacaatt	aatagactgg	atggagcgcg	ataaagttgc	aggaccactt	ctgcgctcgg	9420
cccttccggc	tggtggtttt	attgctgata	aatctggagc	cgggtgagcg	gggtctcgcg	9480
gtatcattgc	agcactgggg	ccagatggta	agccctccc	tatcgtagtt	atctacacga	9540
cggggagtc	ggcaactatg	gatgaacgaa	atagacagat	cgctgagata	ggtgcctcac	9600
tgattaagca	ttggtaactg	tcagaccaag	tttactcata	tatactttag	attgatttaa	9660
aacttcattt	ttaatttaaa	aggatctagg	tgaagatcct	ttttgataat	ctcatgacca	9720
aaatccctta	acgtgagttt	tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaa	9780
gatcttcttg	agatcctttt	tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaaaca	aaaaaacacc	9840
cgctaccagc	ggtggtttgt	ttgccggatc	aagagctacc	aactcttttt	ccgaaggtaa	9900
ctggcttcag	cagagcgag	ataccaaata	ctgttcttct	agtgtagccg	tagttaggcc	9960
accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaata	ctgttaccag	10020
tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgtc	ttaccggggt	ggactcaaga	cgatagttac	10080
cggtataagg	gcagcggtcg	ggctgaacgg	gggttcgctg	cacacagccc	agcttgagac	10140
gaacgacct	caccgaactg	agatacctac	agcgtgagct	atgagaaagc	gccacgcttc	10200
ccgaaggagg	aaaggcgag	aggtatccgg	taagcggcag	ggtcggaaca	ggagagcgca	10260
cgagggagct	tccaggggga	aacgcctggt	atctttatag	tcctgtcggg	tttcgccacc	10320
tctgacttga	cgctcgattt	ttgtgatgct	cgtcaggggg	gcggagccta	tggaaaaacg	10380
ccagcaacgc	ggccttttta	cggttccttg	ccttttgctg	gccttttgct	cacatgttct	10440
ttcctgcgtt	atcccctgat	tctgtggata	accgtattac	cgcctttgag	tgagctgata	10500
ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgca	gcgagtcagt	gagcgaggaa	gcggaagagc	10560
gcccataacg	caaaccgcct	ctcccgcgc	gttgccgat	tcattaatgc	agctggcacg	10620
acaggtttcc	cgactggaaa	gcgggcagtg	agcgcaacgc	aattaatgtg	agttagctca	10680
ctcattaggc	accccaggct	ttacacttta	tgcttccggc	tcgtatgttg	tgtggaattg	10740
tgagcgagata	acaatttcac	acaggaaaca	gctatgacca	tgattacgcc	aagcgcgcaa	10800
ttaaccctca	ctaaggga	caaaagctgg	agctgc			10836

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de composiciones para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas, en donde la combinación comprende:

una primera composición que comprende una hialuronidasa conjugada con un polímero; y
una segunda composición que comprende un taxano dirigido al tumor, en donde el taxano dirigido a un tumor comprende *nab*-paclitaxel o *nab*-docetaxel.

2. Una composición que comprende una hialuronidasa conjugada con un polímero para uso en el tratamiento de cáncer de páncreas, en donde:

la hialuronidasa se utiliza con un taxano dirigido a un tumor y se administra simultáneamente, casi simultáneamente, por separado o secuencialmente a un sujeto con el taxano dirigido a un tumor; y
el taxano dirigido a un tumor comprende *nab*-paclitaxel o *nab*-docetaxel.

3. La combinación o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el taxano dirigido a un tumor es *nab*-paclitaxel.

4. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:

la composición o composiciones se formula o se formulan para administración directa;
la concentración de hialuronidasa es suficiente para degradar el hialuronano asociado al tumor; y
la concentración del taxano dirigido a un tumor es suficiente para lograr el suministro intratumoral del taxano.

5. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende adicionalmente una composición que comprende un análogo de nucleósido que es un agente quimioterapéutico.

6. La combinación o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el análogo de nucleósido se selecciona de entre un análogo de nucleósido de purina o pirimidina, o profármaco del mismo, que es un agente quimioterapéutico.

7. La combinación o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde:

la composición o composiciones se formula o se formulan para administración directa; y
la concentración del análogo de nucleósido es suficiente para lograr el suministro intratumoral.

8. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde:

el análogo de nucleósido o profármaco del mismo, se proporcionan por separado de la hialuronidasa y del taxano dirigido a un tumor; o
el análogo de nucleósido o profármaco del mismo se coformulan con la hialuronidasa; o
el análogo de nucleósido o profármaco del mismo se coformulan con el taxano dirigido a un tumor; o
el análogo de nucleósido o profármaco del mismo se coformulan con la hialuronidasa y el taxano dirigido a un tumor.

9. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la composición o composiciones se formula o se formulan para administración de dosificación única o múltiple.

10. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la composición de hialuronidasa contiene entre 50 unidades de actividad hialuronidasa (U)/ml y 15.000 U/ml, 10 U/ml y 500 U/ml, 1.000 U/ml y 15.000 U/mL, 100 U/mL y 5.000 U/mL, 500 U/mL y 5.000 U/mL o 100 U/mL y 400 U/mL.

11. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la hialuronidasa es una PH20 o forma troncada de la misma que carece de un sitio de unión a glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal o una porción del sitio de unión a GPI.

12. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde:

la hialuronidasa es una PH20 troncada;
la hialuronidasa es activa en condiciones neutras y soluble; y
la PH20 troncado comprende una secuencia de aminoácidos que contiene los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 1, o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de

aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de SEC ID NO: 1 y conserva la actividad hialuronidasa.

- 5 13. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la hialuronidasa es una PH20 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC ID NO: 4-9, 47, 48, 150-170, y 183-189, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NO: 4-9, 47, 48, 150-170 y 183-189 y conserva la actividad de hialuronidasa.
- 10 14. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la composición de taxano dirigido a un tumor contiene una concentración de taxano dirigido a un tumor que está entre 0,01 mg de taxano/ml y 100 mg/ml, tal como 1 mg/ml y 50 mg/ml, 2,5 mg/ml y 25 mg/ml, 5 mg/ml y 15 mg/ml o 10 mg/ml y 100 mg/ml.
- 15 15. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-14, en donde el análogo de nucleósido se selecciona entre fluoropirimidina 5-fluorouracilo, 5-fluoro-2'-desoxicitidina, citarabina, gemcitabina, troxacitabina, decitabina, Azacitidina, pseudoisocitidina, Zebularina, Ancitabina, Fazarabina, 6-azacitidina, capecitabina, N4-octadecil-citarabina, ácido elaidico, citarabina, fludarabina, cladribina, clofarabina, nelarabina, forodesina y pentostatina, o sus derivados.
- 20 16. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-14, en donde el análogo de nucleósido es gemcitabina.
- 25 17. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-15, en donde el análogo de nucleósido es un sustrato para una nucleósido desaminasa, y la nucleósido desaminasa es adenosina desaminasa o citidina desaminasa.
- 30 18. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-17, en donde la composición del análogo de nucleósido comprende una concentración de análogo de nucleósido que está entre 1 mg de análogo de nucleósido/ml y 500 mg/ml, 5 mg/ml y 100 mg/ml, 10 mg/ml y 50 mg/ml, 25 mg/ml y 200 mg/ml o 20 mg/ml y 100 mg/ml.
- 35 19. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, que comprende adicionalmente una composición que comprende un glucocorticoide.
- 40 20. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde el polímero es un polialquilenglicol, dextrano, pululano o celulosa.
- 45 21. La combinación o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el polialquilenglicol se selecciona de entre polietilenglicoles (PEG) y metoxipolietilenglicoles (mPEG).
22. La combinación o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21 que está envasada como un kit e incluye opcionalmente instrucciones de uso.
23. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la hialuronidasa y el taxano dirigido a un tumor se coformulan para la administración en una única composición.

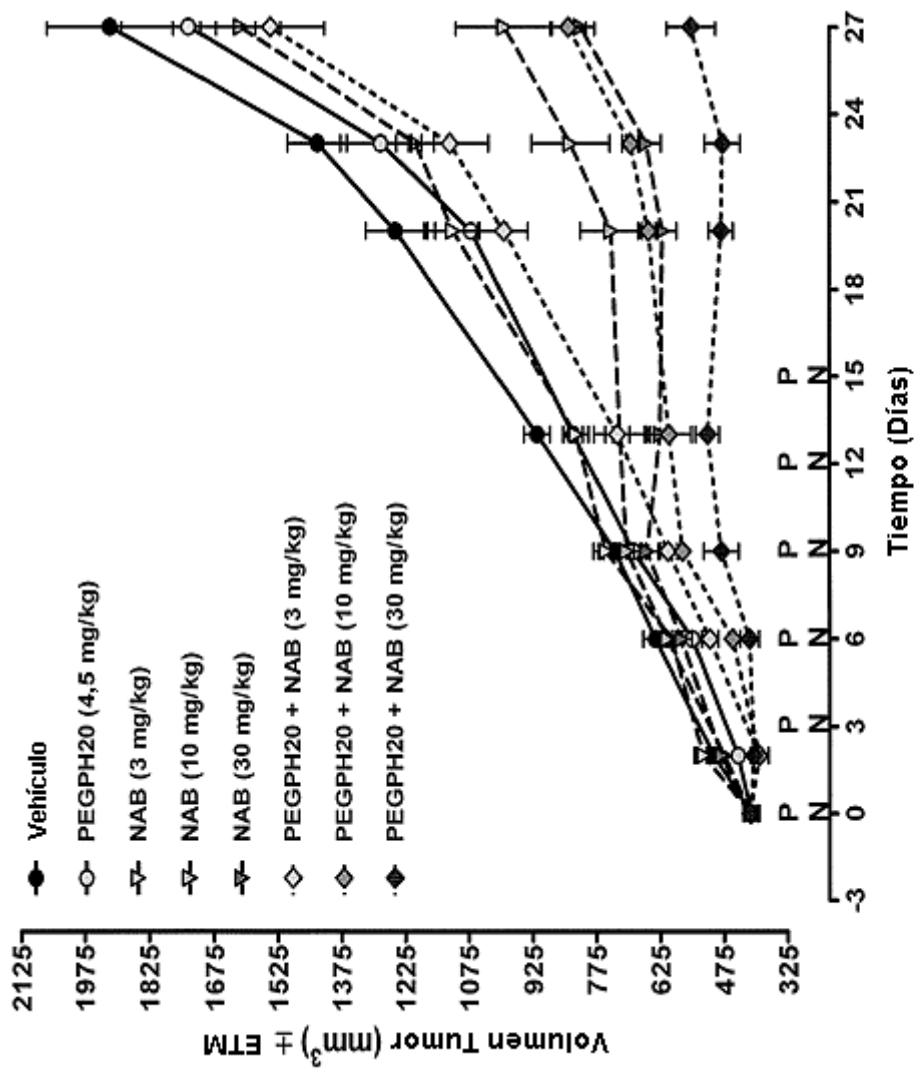


FIGURA 1

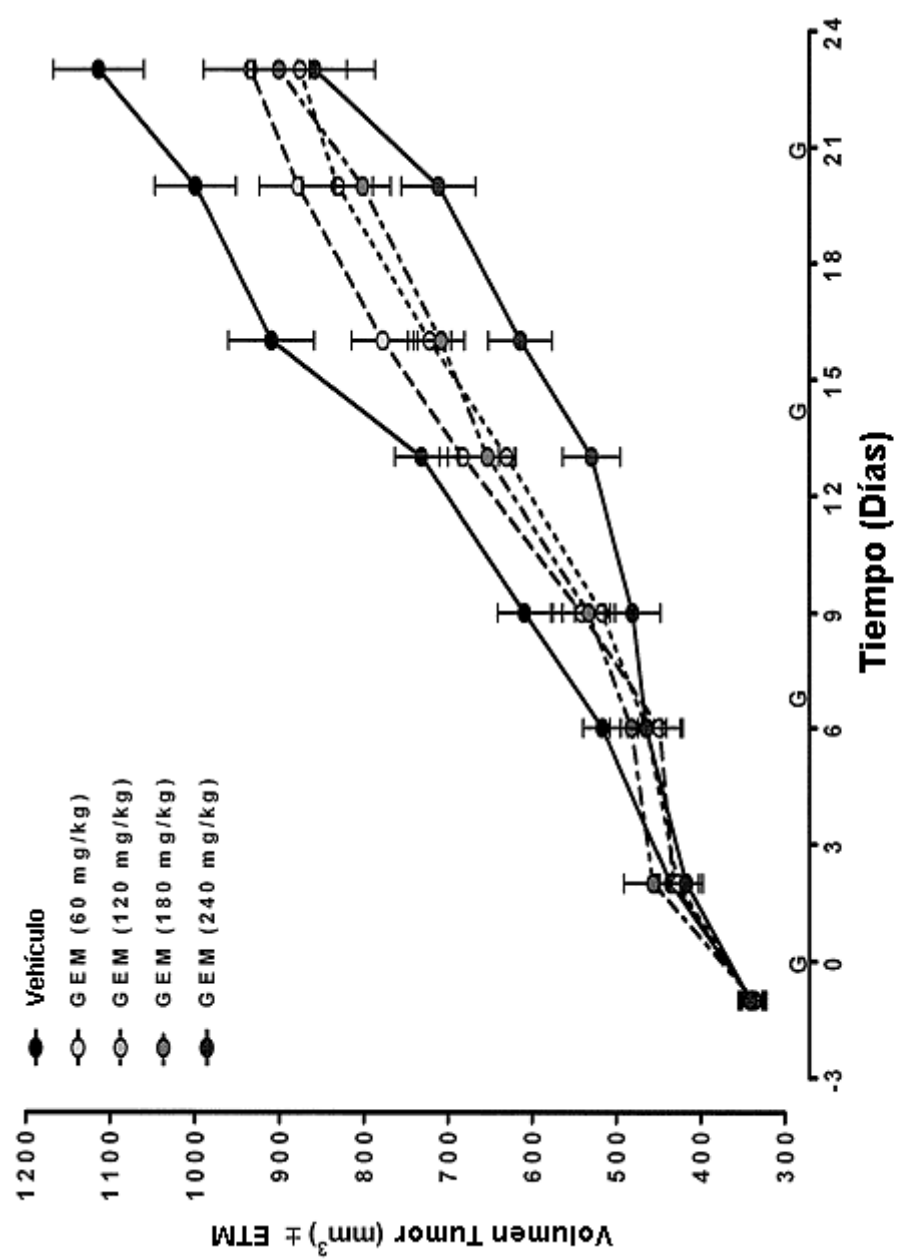


FIGURA 2

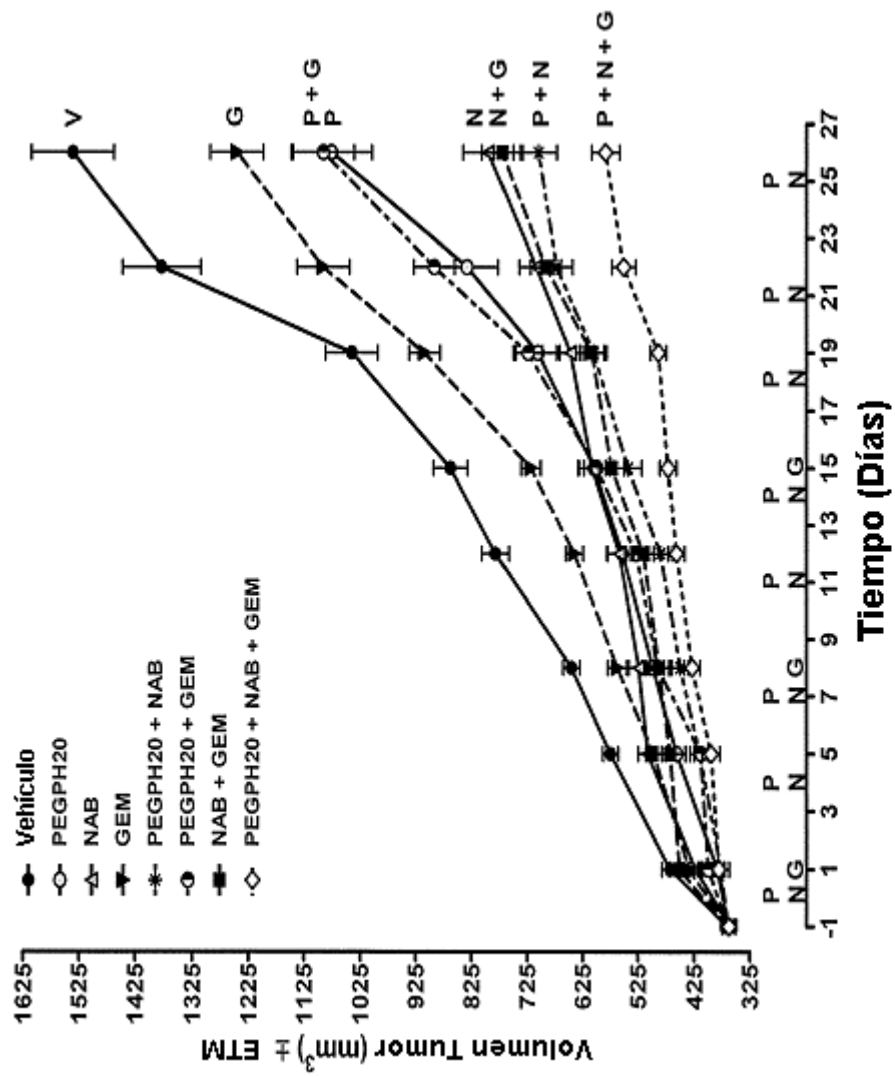


FIGURA 3

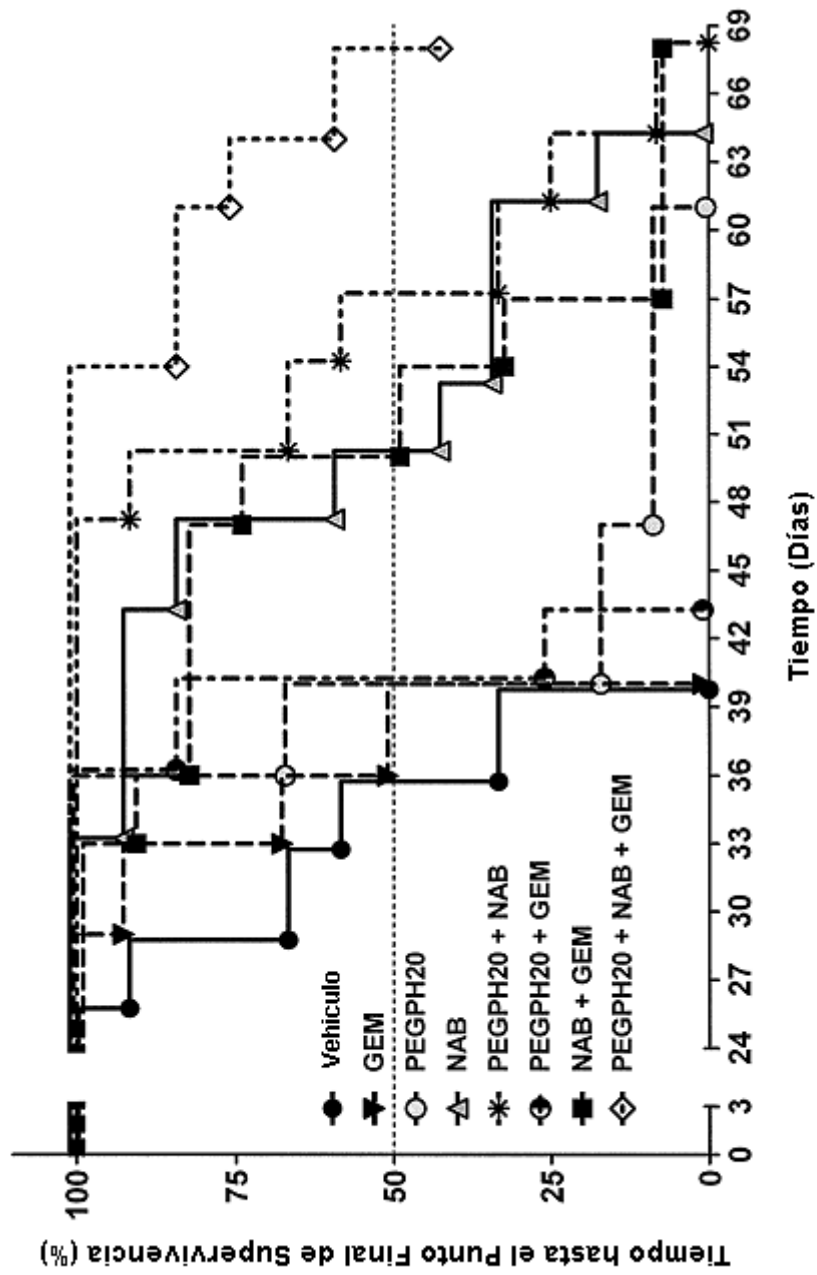


FIGURA 4

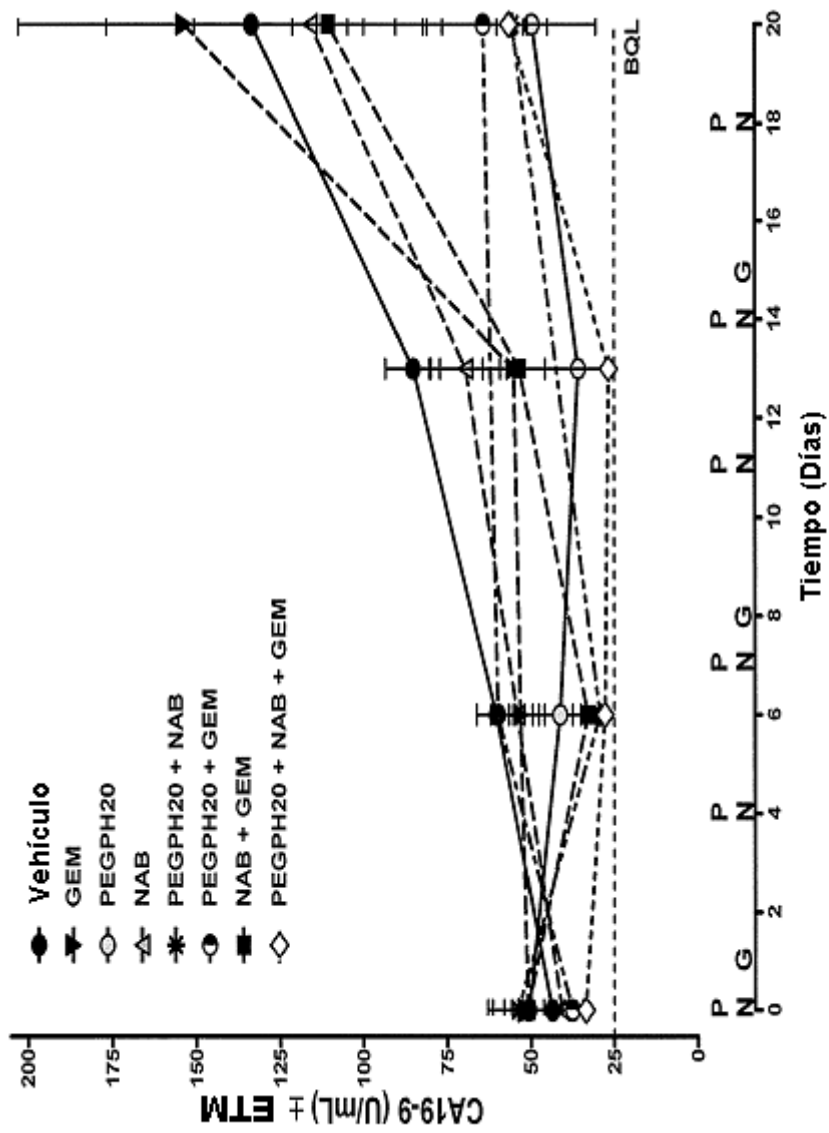


FIGURA 5A

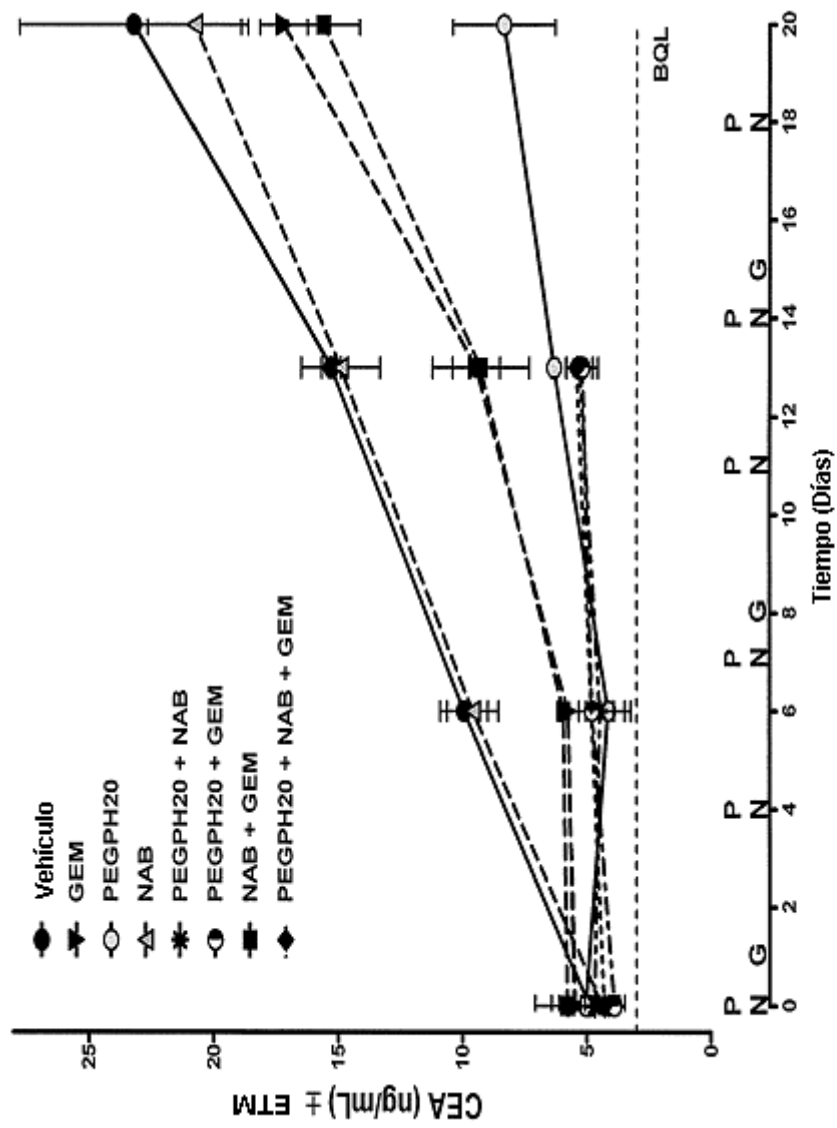


FIGURA 5B

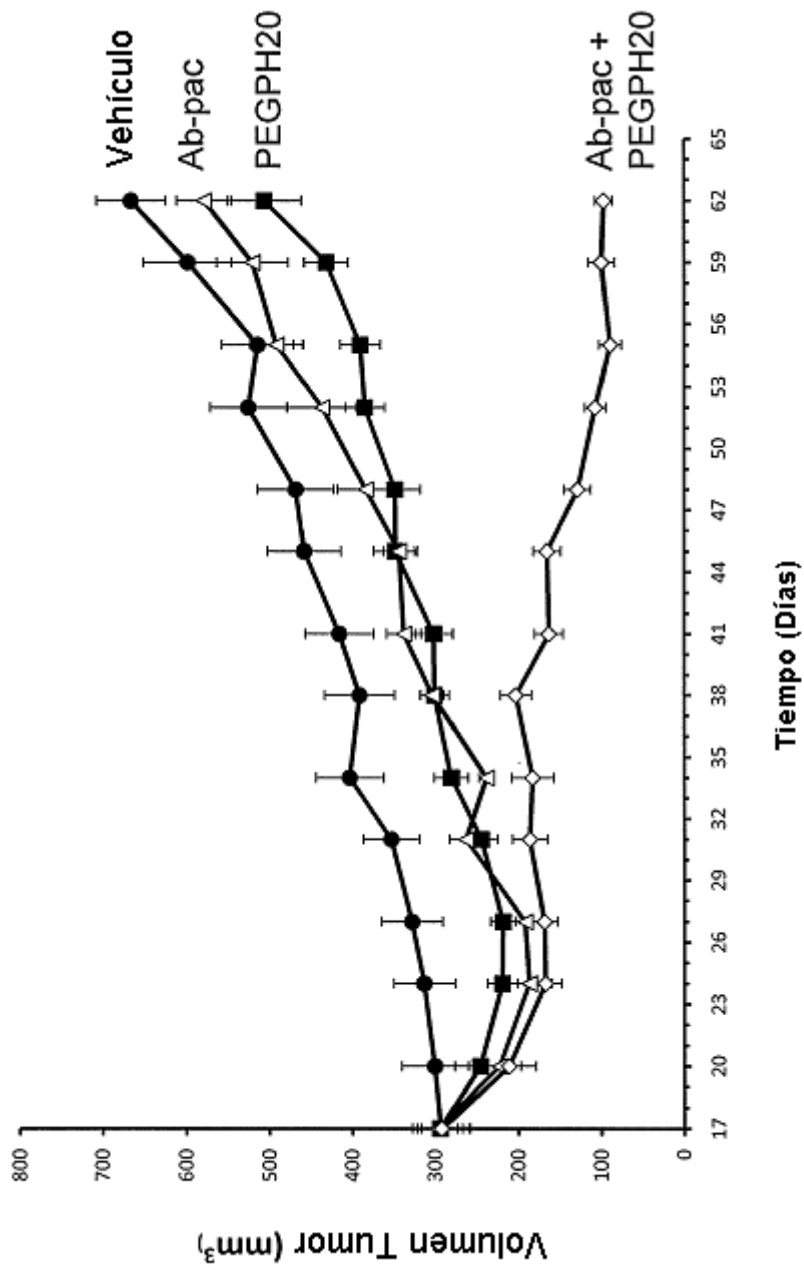


FIGURA 6A

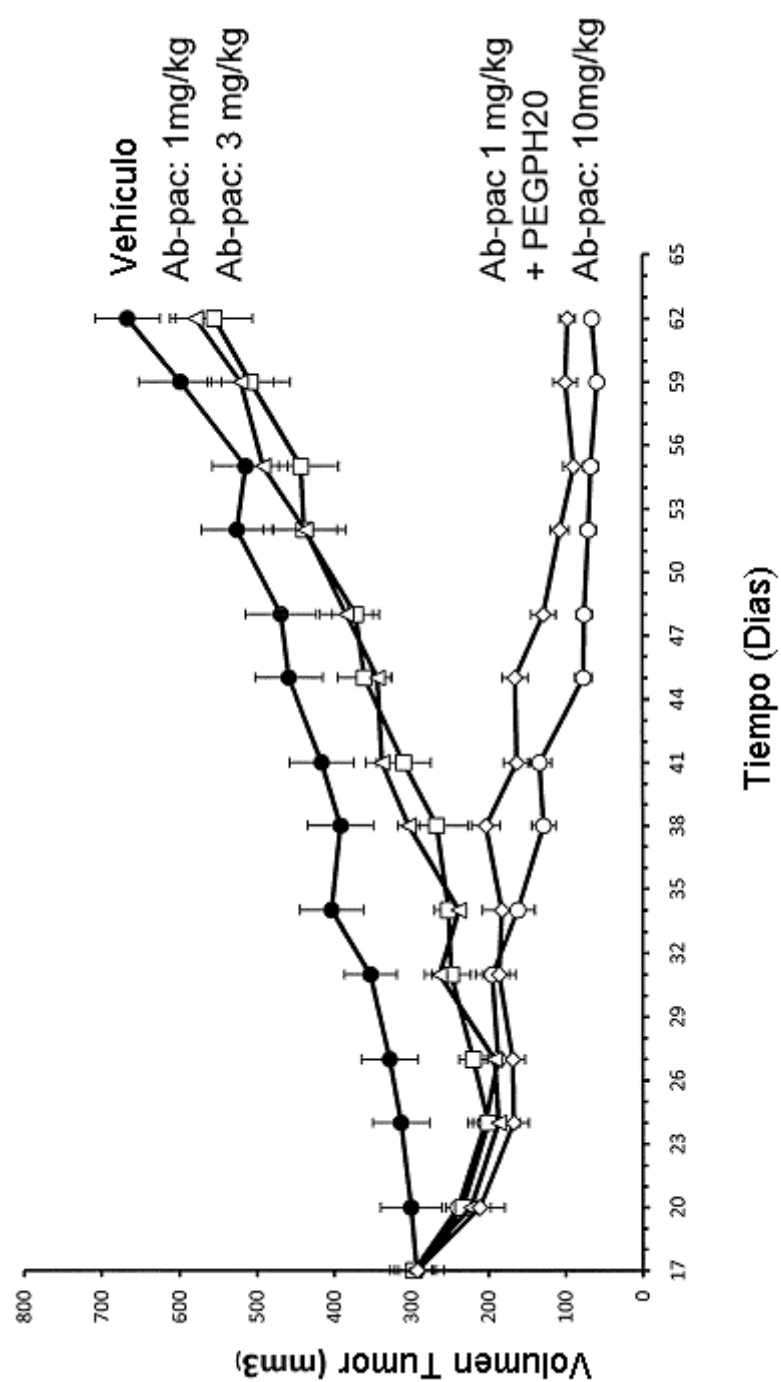


FIGURA 6B