

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 549**

51 Int. Cl.:

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12735366 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2720712**

54 Título: **Formulaciones estables de enzima degradante de hialuronano**

30 Prioridad:

17.06.2011 US 201161520962 P

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

13.04.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YANG, TZUNG-HORNG;
LABARRE, MICHAEL, JAMES;
VAUGHN, DANIEL, EDWARD;
CASTER, CHRISTOPHER, L.;
NICOL, FRANCOIS y
KIM, DONGHYUN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 566 549 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

Formulaciones estables de enzima degradante de hialuronano

5 **Campo de la invención**

Se proporcionan composiciones que son formulaciones estables de una enzima degradante de hialuronano o que son coformulaciones estables de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano, que incluyen un PH20 humano recombinante (rHuPH20).

10

Antecedentes

La diabetes da como resultado hiperglucemia crónica debido a la incapacidad del páncreas para producir cantidades adecuadas de insulina o debido a la incapacidad de las células para sintetizar y liberar la insulina de manera adecuada. La hiperglucemia también pueden experimentar la los pacientes críticos, dando como resultado una mortalidad y morbilidad aumentada. La insulina se ha administrado como agente terapéutico para tratar pacientes que tienen diabetes, incluyendo, por ejemplo, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y diabetes gestacional, para imitar la respuesta de insulina endógena que tiene lugar en individuos normales. La insulina también se ha administrado a pacientes críticos con hiperglucemia para controlar el nivel de glucosa.

15

20

Típicamente, las insulinas de acción rápida se administran a dichos sujetos en respuesta a la hiperglucemia o en previsión de hiperglucemia, tal como después del consumo de una comida, que puede dar como resultado el control glucémico. Sin embargo, las formas de acción rápida actuales de insulina tienen un retraso en la absorción y la acción, y por lo tanto no se aproximan a la rápida acción de la insulina endógena. Por lo tanto, dichas formulaciones no actúan lo suficientemente rápido como para detener la producción de glucosa hepática que tiene lugar poco después de esta primera fase de liberación de insulina. Debido al retraso en la acción farmacológica, las preparaciones de insulina de acción rápida deben administrarse antes de las comidas para lograr el control glucémico deseado. Además, las dosis que tienen que administrarse dan lugar a una duración extendida de la acción que contribuye a la hipoglucemia, y en muchos casos, a obesidad.

25

30

Las enzimas degradantes de hialuronano son enzimas que muestran actividad terapéutica solas y/o se coadministran son agentes terapéuticos, tales como insulina. Por ejemplo, se han desarrollado composiciones de insulina de acción súper rápida que contienen una enzima degradante de hialuronano y una insulina de acción rápida (por ejemplo, análogo de insulina de acción rápida) que da como resultado una composición que, cuando se administra a un sujeto, imita más fielmente la liberación endógena (es decir, natural) post-prandial de insulina de un sujeto no diabético en comparación con únicamente la insulina de acción rápida (véase, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos n.º US20090304665). Existe la necesidad de formulaciones y coformulaciones mejoradas de enzimas degradantes de hialuronano. También existe la necesidad de formulaciones estables de insulina mejoradas para tratar a sujetos, por ejemplo, para controlar los niveles de glucosa en sangre en sujetos diabéticos.

35

40

Sumario

La presente invención proporciona una composición que comprende:

45

una cantidad terapéuticamente eficaz de una hialuronidasa; y
lisil lisina (Lys-Lys) en una cantidad suficiente para hacer que la hialuronidasa sea estable.

En el presente documento se describen composiciones de coformulación estables que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano en una cantidad suficiente para hacer que la composición sea de acción súper rápida. Las coformulaciones estables proporcionadas se formulan para inyección múltiple de fármaco (MDI) o se formulan para infusión continua subcutánea de insulina (CSII), cada una con diferentes requerimientos de estabilidad. En particular, se formulan coformulaciones para CSII para que sean estables a temperaturas elevadas y con agitación, mientras que las coformulaciones para MDI se formulan para que sean estables cuando se almacenan a temperaturas refrigeradas o ambientales.

50

55

Además, en el presente documento se describen composiciones de coformulación estables que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida, una enzima degradante de hialuronano en una cantidad suficiente para hacer que la composición sea de acción súper rápida, NaCl a una concentración entre o de aproximadamente entre 50 mM a 200 mM, una cantidad eficaz antimicrobiana de un conservante o de una mezcla de conservantes y un agente o agentes estabilizantes. Las coformulaciones proporcionadas tienen un pH de entre o aproximadamente entre 6,8 a 7,8 y se formulan de tal forma que las composiciones son estables durante al menos 6 meses a una temperatura desde o desde aproximadamente 2 °C a 8 °C y/o durante al menos 14 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 20 °C a 30 °C.

60

65

En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano en la coformulación estable retiene al menos un 50 % de la actividad de hialuronidasa inicial durante al menos 6 meses a una temperatura entre o desde entre 2 °C a 8 °C y/o

5 durante al menos 14 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 20 °C a 30 °C y/o la insulina retiene una potencia o recuperación de al menos el 90 % del nivel inicial de insulina en la composición durante al menos 6 meses a una temperatura desde o desde aproximadamente 2 °C a 8 °C y/o durante al menos 14 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 20 °C a 30 °C y/o la insulina retiene al menos un 90 % de la pureza inicial de la insulina durante al menos 6 meses a una temperatura desde o desde aproximadamente 2 °C a 8 °C y/o durante al menos 14 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 20 °C a 30 °C y/o la insulina retiene menos de un 2 % de especies de insulina de alto peso molecular (HMWt) durante al menos 6 meses a una temperatura desde o desde aproximadamente 2 °C a 8 °C y/o durante al menos 14 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 20 °C a 30 °C. Por ejemplo, la enzima degradante de hialuronano en la coformulación estable retiene al menos un 55 %, 60 %; 65 %; 70 %; 80 %; 85 %; 90 %; 95 % o más de la actividad inicial de hialuronidasa durante al menos 6 meses a una temperatura desde o desde aproximadamente 2 °C a 8 °C y/o durante al menos 14 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 20 °C a 30 °C y la pureza o la potencia de la insulina es de al menos el 91 %, 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o más durante al menos 6 meses a una temperatura desde o desde aproximadamente 2 °C a 8 °C y/o durante al menos 14 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 20 °C a 30 °C.

20 El pH de las composiciones de coformulación estables puede ser de entre o aproximadamente entre 7,0 a 7,6. Por ejemplo, el pH de la coformulación es o es de aproximadamente 6,8 ± 0,2, 6,9 ± 0,2, 7,0 ± 0,2, 7,1 ± 0,2, 7,2 ± 0,2, 7,3 ± 0,2, 7,4 ± 0,2, 7,5 ± 0,2, 7,6 ± 0,2, 7,7 ± 0,2 o 7,8 ± 0,2. La concentración de NaCl en las composiciones de coformulación estable es de entre o de aproximadamente entre 80 mM a 200 mM, 80 mM a 140 mM, 50 mM a 100 mM, 80 mM a 100 mM, 50 mM a 80 mM, 100 mM a 140 mM o 120 mM a 140 mM. Por ejemplo, la concentración de NaCl de la coformulación estable es de o es de aproximadamente o de al menos 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM, 100 mM, 120 mM, 125 mM, 130 mM, 135 mM, 140 mM, 145 mM, 150 mM, 155 mM, 160 mM, 165 mM, 170 mM, 175 mM, 180 mM, 185 mM, 190 mM, 195 mM o 200 mM. En dichos ejemplos, la cantidad superior de NaCl en las composiciones de menos de 100 mM es de hasta 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM o 200 mM. En algunos ejemplos, las coformulaciones estables contienen una cantidad suficiente de un agente tamponador para mantener un intervalo de pH de entre o entre aproximadamente 6,8 a 7,8.

30 Las coformulaciones estables descritas en el presente documento pueden ser estables a una temperatura desde o desde aproximadamente 2 °C a 8 °C, incluido, durante al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, 13 meses, 14 meses, 15 meses, 16 meses, 17 meses, 18 meses, 19 meses, 20 meses, 21 meses, 22 meses, 23 meses, 24 meses, 25 meses, 26 meses, 27 meses, 28 meses, 29 meses o 30 meses. Por ejemplo, las coformulaciones son estables a una temperatura desde o desde aproximadamente 2 °C a 8 °C, incluido, durante al menos 18 meses o al menos 24 meses. En otro ejemplo, las coformulaciones estables son estables a una temperatura desde o desde aproximadamente 20 °C a 30 °C, incluido, durante al menos 15 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días o 50 días. Por ejemplo, las coformulaciones son estables a una temperatura desde o desde aproximadamente 20 °C a 30 °C, incluido, durante al menos un mes.

40 También se describen en el presente documento composiciones de coformulación estables que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida, una enzima degradante de hialuronano en una cantidad suficiente para hacer que la composición sea de acción súper rápida, NaCl a una concentración entre o de aproximadamente entre 120 mM a 200 mM, una cantidad eficaz antimicrobiana de un conservante o de una mezcla de conservantes, y un agente o agentes estabilizantes. Las coformulaciones tienen un pH de entre o aproximadamente entre 6,5 a 7,5 y las composiciones son estables durante al menos 3 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 32 °C a 40 °C o son estables durante al menos 3 horas en agitación.

50 En algunos ejemplos, la coformulación estable contiene además una cantidad eficaz de un inhibidor de la hialuronidasa, tales como, pero sin limitación, proteínas, glucosaminoglucanos (GAG), polisacáridos, ácidos grasos, lanostanoides, antibióticos, anti-nematodos, compuestos orgánicos sintéticos y/o un componente bioactivo de origen vegetal. Un ejemplo de un componente bioactivo de origen vegetal es un alcaloide, antioxidante, polifenol, flavonoide, terpenoides y/o fármacos antiinflamatorios. En algunos ejemplos, el inhibidor de hialuronidasa en las coformulaciones estables no forma complejos covalentes con la enzima degradante de hialuronano o insulina. Los ejemplos de inhibidores de hialuronidasa son, pero sin limitación, un inhibidor de hialuronidasa sérica, glucoproteína de *Withania somnifera* (WSG), heparina, sulfato de heparina, sulfato de dermatano, quitosanos, β-(1,4)-galactooligosacáridos, verbascosa sulfatada, planteosa sulfatada, pectina, poli(estireno-4-sulfonato), sulfato de dextrano, alginato de sodio, polisacárido de *Undaria pinnatifida*, polímero de condensación de ácido mandélico, ácido eicosatrienoico, ácido nervónico, ácido oleanólico, ácido aristolócico, ajmalina, reserpina, flavona, desmetoxicentauredina, quercetina, apigenina, kaempferol, silibina, luteolina, luteolin-7-glucósido, floretina, apiína, hesperidina, hesperidina sulfonatada, calcosin-7-O-β-D-glucopiranosido, flavona-7-sulfato de sodio, flavona 7-fluoro-4'-hidroxiflavona, 4'-cloro-4,6-dimetoxicalcona, 5-hidroxiflavona 7-sulfato de sodio, miricetina, rutina, morina, glicirricina, vitamina C, ácido D-isoascórbico, 1,4-lactona D-sacárica, 6-hexadecanoato de ácido L-ascórbico (Vcpal), vitamina C 6-O-acilada, catequina, ácido nordihidroguaiarético, curcumina, galato de N-propilo, ácido tánico, ácido elágico, ácido gálico, fluorofucofuroecol A, diecol, 8,8'-biecol, prociandina, gosalol, celecoxib, nimesulida, dexametasona, indometacina, fenoprofeno, fenilbutazona, oxifenbutazona, salicilatos, cromoglicato disódico,

5 aurotiomalato de sodio, transilist, traxanox, ivermectina, lincomicina y espectinomina, sulfametoxazol y trimetoprima, sulfato de neomicina, ácido 3 α -acetilpoliporénico A, ácido (25S)-(+)-12 α -hidroxi-3 α -metilcarboxiacetato-24-metilanosta-8,24(31)-dien-26-oico, lanostanoide, ácido poliporénico C, PS53 (polímero de hidroquinona-ácido sulfónico-formaldehído), polímero de poli(estireno-4-sulfonato), VERSA-TL 502, ácido 1-tetradecano sulfónico, 10 polímero de condensación de ácido mandélico (SAMMA), 1,3-diacetilbencimidazol-2-tiona, bencimidazol-2-tiona N-monoacilada, bencimidazol-2-tiona N,N'-diacilada, derivado de alquil-2-fenilindol, 3-propanoilbenzoxazol-2-tiona, derivado de indol N-alkilado, derivado de indol N-acilado, derivado de benzotiazol, derivados de indol-2- y 3-carboxamida N-sustituidos, análogos halogenados (cloro y flúor) de derivados de indol-2- y 3-carboxamida N-sustituidos, 2-(4-hidroxifenil)-3-fenilindol, carboxamidas de indol, acetamidas de indol, 3-benzolil-1-metil-4-fenil-4-piperidinol, derivado de benzoato de fenil benzoilo, derivado de 1-arginina, HCL guanidinio, L-NAME, HCN, linamarina, amigdalina, hederagenina, aescina, CIS-hinokiresinol y/o 1,3-di-p-hidroxifenil-4-penten-1-ona.

15 En algunos ejemplos, las coformulaciones estables contienen un inhibidor de hialuronidasa que es un oligosacárido de hialuronano (HA) a una concentración de entre o aproximadamente entre 1 mg/ml a 20 mg/ml. En algunos ejemplos, el oligosacárido HA es un disacárido o un tetrasacárido. En otros ejemplos, el oligosacárido tiene un extremo reductor reaccionado.

20 Las coformulaciones estables descritas en el presente documento se formulan de tal forma que la enzima degradante de hialuronano en la coformulación retiene al menos un 50 % de la actividad de hialuronidasa inicial durante al menos 3 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 32 °C a 40 °C o es estable durante al menos 3 horas en agitación, y/o la insulina en la composición retiene una potencia o recuperación de al menos el 90 % del nivel inicial de insulina en la composición durante al menos 3 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 32 °C a 40 °C o es estable durante al menos 3 horas en agitación, y/o retiene al menos un 90 % de la pureza inicial de insulina durante al menos 3 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 32 °C a 40 °C o es estable durante al menos 3 horas en agitación, y/o retiene menos del 2 % en especies de insulina de alto peso molecular (HMWt) durante al menos 3 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 32 °C a 40 °C o es estable durante al menos 3 horas en agitación. En un ejemplo, las coformulaciones estables se formulan de tal forma que la enzima degradante de hialuronano en la composición retiene al menos el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de la actividad inicial de hialuronidasa durante al menos 3 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 32 °C a 40 °C o es estable durante al menos 3 horas en agitación. En otro ejemplo, las coformulaciones estables se formulan de tal forma que la pureza o potencia de la insulina es de al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más durante al menos 3 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 32 °C a 40 °C o es estable durante al menos 3 horas en agitación.

35 En algunos ejemplos, el pH de las coformulaciones estables descritas en el presente documento es o es de aproximadamente 6,3 \pm 0,2, 6,4 \pm 0,2, 6,5 \pm 0,2, 6,6 \pm 0,2, 6,7 \pm 0,2, 6,8 \pm 0,2, 6,9 \pm 0,2, 7,0 \pm 0,2, 7,1 \pm 0,2, 7,2 \pm 0,2, 7,3 \pm 0,2, 7,4 \pm 0,2 o 7,5 \pm 0,2. En otros ejemplos, la concentración de NaCl de las composiciones de coformulación estable es de entre o entre aproximadamente de 150 mM a 200 mM o de 160 mM a 180 mM. Por ejemplo, la concentración de NaCl es o es de aproximadamente 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 155 mM, 160 mM, 165 mM, 170 mM, 175 mM, 180 mM, 185 mM, 190 mM, 195 mM o 200 mM. En algunos ejemplos, la coformulación estable es estable a o aproximadamente a 37 °C durante al menos 3 días. En otros ejemplos, la coformulación estable es estable durante al menos 4 días, al menos 5 días o al menos 6 días. En algunos ejemplos, las coformulaciones estables contienen una cantidad suficiente de un agente tamponador para mantener el intervalo de pH a entre o entre aproximadamente 6,5 a 7,5.

45 Las enzimas degradantes de hialuronano contenidas en las composiciones de coformulación estables descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, hialuronidasas, tales como hialuronidasas animales, incluyendo humanas, en particular formas solubles de las mismas, y/o condroitinasas. Las enzimas degradantes de hialuronano ejemplares son hialuronidasas y/o condroitinasas. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano es una hialuronidasa que es activa a pH neutro. En otros ejemplos, la enzima degradante de hialuronano carece de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) o no está asociado a membrana cuando se expresa a partir de una célula. Por ejemplo, la enzima degradante de hialuronano contiene truncamientos C-terminales de uno o más restos de aminoácidos para eliminar la totalidad o parte de un anclaje de GPI. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano en las coformulaciones estables descritas en el presente documento es una hialuronidasa que es una PH20. Los ejemplos de hialuronidasas PH20 son hialuronidasas PH20 no humanas o humanas. Se incluyen hialuronidasas PH20 que tienen una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 1, o tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 % con una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. Por ejemplo, la PH20 tiene al menos un 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 SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. Se incluyen polipéptidos de PH20 que tienen 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 la SEQ ID NO: 1. Las variantes incluyen polipéptidos de PH20 que muestran una identidad de secuencia de al menos el 85 % 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 la SEQ ID NO: 1 y retienen actividad de hialuronidasa. En algunos ejemplos, el PH20 en las coformulaciones estables descritas en el presente documento tiene al menos un 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 la SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano es una PH20 truncada que es un polipéptido de PH20 truncado en C-terminal que incluye cualquier forma entre polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de los mismos.

En algunos ejemplos, la cantidad de PH20 en las coformulaciones estables descritas en el presente documento es de entre o aproximadamente entre 0,1 µg/ml a 100 µg/ml, 1 µg/ml a 50 µg/ml o 1 µg/ml a 20 µg/ml. Por ejemplo, la cantidad de PH20 es o es de aproximadamente 5 µg/ml. En otros ejemplos, la actividad específica de PH20 es o es de entre 75 Unidades (U)/µg a 120 U/µg o es de al menos, aproximadamente o de 75 Unidades (U)/µg, 80 U/µg, 85 U/µg, 90 U/µg, 100 U/µg, 110 U/µg o 120 U/µg. La cantidad de enzima degradante de hialuronano en las coformulaciones estables descritas en el presente documento es de entre o aproximadamente entre 10 U/ml a 5000 U/ml, 50 U/ml a 4000 U/ml, 100 U/ml a 2000 U/ml, 300 U/ml a 2000 U/ml, 600 U/ml a 2000 U/ml, o 100 U/ml a 1000 U/ml. Por ejemplo, la cantidad de una enzima degradante de hialuronano es de al menos o es de aproximadamente o es de 30 U/ml, 35 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 250 U/ml, 300 U/ml, 350 U/ml, 400 U/ml, 450 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 700 U/ml, 800 U/ml, 900 U/ml, 1000 U/ml o 2000 U/ml. En una coformulación estable ejemplar, la cantidad de una enzima degradante de hialuronano es o es de aproximadamente 600 U/ml.

La insulina de acción rápida puede ser, por ejemplo, monomérica o multimérica, tal como dimérica o hexamérica. En un ejemplo, la insulina de acción rápida es una insulina humana de acción rápida. En otro ejemplo, la insulina de acción rápida es una insulina regular, por ejemplo, una insulina humana o insulina de cerdo. En un ejemplo, la insulina de acción rápida es una insulina regular y la concentración de NaCl de la coformulación estable descrita en el presente documento es de 50 mM a 80 mM. Entre las insulinas de acción rápida se encuentran las insulinas regulares, tales como, una insulina con una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 103 y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 104 o una insulina con una cadena A con una secuencia de aminoácidos expuesta como las posiciones de restos de aminoácidos 88-108 de SEQ ID NO: 123 y una cadena B con una secuencia de aminoácidos expuesta como las posiciones de restos de aminoácidos 25-54 de SEQ ID NO: 123. La insulina puede ser insulina recombinante o puede sintetizarse o sintetizarse parcialmente o puede aislarse a partir de una fuente natural. La insulina de acción rápida puede ser un análogo de insulina. Los ejemplos de análogos de insulina son un análogo de insulina seleccionado de entre una insulina que tiene una cadena A con una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 103 y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 147-149. En algunas coformulaciones estables ejemplares descritas en el presente documento, la insulina de acción rápida es una insulina aspart que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 147 (cadena B) y las concentraciones de NaCl son de entre o son de entre aproximadamente 80 mM a 160 mM. En otras coformulaciones estables ejemplares descritas en el presente documento, la insulina de acción rápida es una insulina glulisina que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 149 (cadena B) y las concentraciones de NaCl son de entre o son de entre aproximadamente 80 mM a 200 mM. En otra coformulación estable ejemplar más descrita en el presente documento, la insulina de acción rápida es una insulina lispro que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 148 (cadena B) y las concentraciones de NaCl son de entre o de entre aproximadamente 50 mM a 120 mM.

En algunos ejemplos, la insulina en la coformulación estable proporcionada en el presente documento es en una cantidad que es de 10 U/ml a 1000 U/ml, 50 U/ml a 500 U/ml, 100 U/ml a 1000 U/ml o 500 U/ml a 1000 U/ml, incluidos. Por ejemplo, la cantidad de insulina de acción rápida es de al menos o es de aproximadamente o es de 10 U/ml, 20 U/ml, 30 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 250 U/ml, 300 U/ml, 350 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml o 1000 U/ml. En una coformulación estable ejemplar, la cantidad de insulina de acción rápida es de o es de aproximadamente 100 U/ml. En otra coformulación estable ejemplar, la insulina de acción rápida es un análogo de insulina y la enzima degradante de hialuronano es una PH20.

Las coformulaciones estables incluyen opcionalmente un agente tamponador, tal como, pero sin limitación, un agente de unión no metálico o un agente de unión metálico. En algunos ejemplos, el agente tamponador se selecciona entre Tris, histidina, fosfato o citrato. En una coformulación estable ejemplar, el agente tamponador es Tris. La concentración del agente tamponador es de entre o es de entre aproximadamente 1 mM a 100 mM, 10 mM a 50 mM o 20 mM a 40 mM. Por ejemplo, la concentración del agente tamponador es de o es de aproximadamente o es de al menos 1 mM, 5 mM, 10mM, 15 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM, 30 mM, 31 mM, 32 mM, 33 mM, 34 mM, 35 mM, 36 mM, 37 mM, 38 mM, 39 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM o más. En una coformulación estable ejemplar, la concentración del agente tamponador es de o es de aproximadamente 30 mM.

Las composiciones de coformulación estables incluyen una cantidad antimicrobiana eficaz del conservante que elimina o inhibe la propagación de microorganismos en una muestra de la composición, de tal forma que tiene lugar una reducción de organismos bacterianos de al menos 1,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación. En algunos ejemplos, la cantidad antimicrobiana eficaz del conservante elimina o inhibe la propagación de organismos microbianos de tal forma que, cuando se ensayan en una prueba de eficacia conservadora antimicrobiana (APET), después de la inoculación de la composición con un inóculo microbiano hay una reducción de al menos 1,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación, o una reducción de al menos 3,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a los 14 días después de la inoculación, al menos ningún aumento posterior de organismos bacterianos tras 28 días después de la inoculación, y al menos ningún aumento de organismos fúngicos tras 7 días después de la inoculación. En otros ejemplos, la cantidad antimicrobiana eficaz del conservante elimina o inhibe la propagación de organismos microbianos de tal forma que, cuando se ensayan en una prueba de eficacia conservadora antimicrobiana (APET), después de la inoculación de la composición con un inóculo microbiano hay una reducción de al menos 1,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a las 24 horas después de la inoculación, o una reducción de al menos 3,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación, ningún aumento posterior de organismos bacterianos tras 28 días después de la inoculación, o una reducción de al menos 1,0 log₁₀ unidades de organismos fúngicos a los 14 días después de la inoculación, y al menos ningún aumento adicional de organismos fúngicos tras 28 días después de la inoculación. En otro ejemplo más, la cantidad antimicrobiana eficaz del conservante elimina o inhibe la propagación de organismos microbianos de tal forma que, cuando se ensayan en una prueba de eficacia conservadora antimicrobiana (APET), después de la inoculación de la composición con un inóculo microbiano hay una reducción de al menos 2,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a las 6 horas después de la inoculación, o una reducción de al menos 3,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a las 24 horas después de la inoculación, ninguna recuperación de organismos bacterianos tras 28 días después de la inoculación de la composición con el inóculo microbiano, o una reducción de al menos 2,0 log₁₀ unidades de organismos fúngicos a los 7 días después de la inoculación, y al menos ningún aumento adicional de organismos fúngicos tras 28 días después de la inoculación.

El conservante (o los conservantes) en las coformulaciones estables pueden incluir uno o más de un conservante fenólico (o conservantes fenólicos), un conservante no fenólico (o conservantes no fenólicos) o un conservante fenólico (o conservantes fenólicos) y un conservante no fenólico (o conservantes no fenólicos). Por ejemplo, el conservante (o conservantes) se selecciona de entre, pero sin limitación, fenol, m-cresol, el metilparabeno, alcohol bencílico, timerosal, cloruro de benzalconio, 4-cloro-1-butanol, diclorhidrato de clorhexidina, digluconato de clorhexidina, L-fenilalanina, EDTA, bronopol, acetato fenilmercúrico, glicerol, imidourea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, o-cresol, p-cresol, clorocresol, cetrimida, cloruro de bencetonio, etil parabeno, propil parabeno, butil parabeno y cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, la coformulación estable contiene un solo conservante. En otros ejemplos, la coformulación estable contiene una mezcla de conservantes que contiene 2, 3 o 4 conservantes diferentes. En algunos ejemplos, las coformulaciones estables contienen al menos un conservante fenólico. En un ejemplo particular, los uno o más conservantes son fenol, m-cresol o fenol y m-cresol.

La cantidad total de los uno o más agentes conservantes como porcentaje (%) de la concentración en masa (p/v) en las coformulaciones estables es de o es de entre el 0,1 % y el 0,4 %, del 0,1 % al 0,3 %, del 0,15 % al 0,325 %, del 0,15 % al 0,25 %, del 0,1 % al 0,2 %, del 0,2 % al 0,3 % o del 0,3 % al 0,4 %, incluidos. En algunos ejemplos, los conservantes son fenol y m-cresol y la cantidad como % de concentración en masa (p/v) en la formulación es de entre o aproximadamente de entre el 0,1 % al 0,25 % de fenol y entre o aproximadamente entre el 0,05 % al 0,2 % de m-cresol, es de entre o aproximadamente entre el 0,10 % al 0,2 % de fenol y de entre o aproximadamente entre el 0,6 % al 0,8 % de m-cresol, de entre o aproximadamente entre el 0,1 % al 0,15 % de fenol y del 0,8 % al 0,15 % de m-cresol, es de entre o aproximadamente entre el 0,10 % al 0,15 % de fenol y entre o aproximadamente entre el 0,06 al 0,09 % de m-cresol o es de entre o aproximadamente entre el 0,12 % al 0,18 % de fenol y entre o aproximadamente entre el 0,14 al 0,22 % de m-cresol. En coformulaciones ejemplares, los conservantes son fenol y m-cresol y la cantidad como % de concentración en masa (p/v) en la formulación es de o es de aproximadamente el 0,1 % de fenol y el 0,075 % de m-cresol, es del o es aproximadamente del 0,1 % de fenol y del 0,15 % de m-cresol, es del o es aproximadamente del 0,125 % de fenol y del 0,075 % de m-cresol, es del o es aproximadamente del 0,13 % de fenol y del 0,075 % de m-cresol, es del o es aproximadamente del 0,13 % de fenol y del 0,08 % de m-cresol, es del o es aproximadamente del 0,15 % de fenol y del 0,175 % de m-cresol o es del o es de aproximadamente el 0,17 % de fenol y del 0,13 % de m-cresol.

Las coformulaciones estables contienen un agente estabilizante que se selecciona de entre, pero sin limitación, un aminoácido, derivado de aminoácido, amina, azúcar, polioles, sal o tensioactivo. En algunos ejemplos, las coformulaciones estables contienen un solo agente estabilizante. En otros ejemplos, las coformulaciones estables contienen 2, 3, 4, 5 o 6 agentes estabilizantes diferentes. En algunos ejemplos, el agente estabilizante es un aminoácido, derivado de aminoácido o amina que se selecciona de entre L-arginina, glutamina, ácido glutámico, glicina, lisina, metionina, prolina, Lys-Lys, Gly-Gly, óxido de trimetilamina (TMAO), betaína o sales de los mismos. En un ejemplo particular, el aminoácido es glicina o prolina. La concentración del aminoácido es de entre o aproximadamente entre 0,01 M a 1 M, 0,01 M a 0,1 M, 0,1 M a 0,75 M o 0,2 M a 0,5 M, incluidos. En algunos ejemplos, el agente estabilizante es un azúcar o poliol que se selecciona de entre, pero sin limitación, glicerol, sorbitol, manitol, inositol, sacarosa y trehalosa.

En una coformulación estable ejemplar, el agente estabilizante es un tensioactivo y la cantidad de tensioactivo como % de concentración en masa (p/v) en la formulación es de entre o aproximadamente de entre el 0,005 % al 1,0 %, del 0,01 % al 0,5 %, del 0,01 % al 0,1 %, del 0,01 % al 0,05 %, o del 0,01 % al 0,02 %. Por ejemplo, el agente estabilizante es un tensioactivo y la cantidad de tensioactivo como % de concentración en masa (p/v) en la formulación es o es aproximadamente del 0,001 %, 0,005 %; 0,01 %; 0,015 %; 0,02 %; 0,025 %; 0,03 %; 0,035 %; 0,04 %; 0,045 %; 0,05 %; 0,055 %; 0,06 %; 0,065 %; 0,07 %; 0,08 % o 0,9 %. El tensioactivo en las coformulaciones estables puede seleccionarse de entre, pero sin limitación, un polipropilenglicol, polietilenglicol, glicerina, sorbitol, poloxamer y polisorbato. Por ejemplo, el tensioactivo se selecciona de entre poloxamer 188, polisorbato 20 o polisorbato 80. En una coformulación estable ejemplar, el agente estabilizante es un tensioactivo que es poloxamer 188 y se proporciona en una cantidad como % de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,05 %. En otra coformulación estable ejemplar, el agente estabilizante es un tensioactivo que es polisorbato 20 y se proporciona en una cantidad como % de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,05 %. En otra coformulación estable ejemplar más, el agente estabilizante es un tensioactivo que es polisorbato 80 y se proporciona en una cantidad como % de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,05 %.

Las coformulaciones estables incluyen opcionalmente un modificador de la tonicidad, que se selecciona de entre, pero sin limitación, glicerina, sal, aminoácidos, polialcoholes o trehalosa, para mantener la osmolaridad a entre o aproximadamente entre 245 mOsm/kg a 305 mOsm/kg. En algunos ejemplos, el modificador de la tonicidad mantiene la osmolaridad de la formulación a aproximadamente o a 245 mOsm/kg, 250 mOsm/kg, 255 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 265 mOsm/kg, 270 mOsm/kg, 275 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 285 mOsm/kg, 290 mOsm/kg, 300 mOsm/kg o 305 mOsm/kg. En una coformulación estable ejemplar, el modificador de la tonicidad mantiene la osmolaridad de la formulación a o aproximadamente a 275 mOsm/kg. En un ejemplo, el modificador de la tonicidad es glicerina que está presente en la coformulación a una concentración de menos de 60 mM, menos de 55 mM, menos de 50 mM, menos de 45 mM, menos de 40 mM, menos de 35 mM, menos de 30 mM, menos de 25 mM, menos de 20 mM, menos de 15 mM o menos de 10 mM. En una coformulación estable ejemplar, la insulina de acción rápida es un análogo de insulina que es insulina aspart y la formulación contiene glicerina a una concentración de entre o de aproximadamente entre 20 mM a 50 mM, incluidos. En otra coformulación estable ejemplar, la insulina de acción rápida es una insulina regular o es insulina lispro y la formulación comprende glicerina a una concentración de entre o aproximadamente entre 50 mM a 60 mM, incluidos.

En algunos ejemplos, las coformulaciones estables contienen opcionalmente un antioxidante. En otros ejemplos, las coformulaciones estables contienen opcionalmente un tensioactivo y/u oligosacáridos de hialuronano, y también contienen un antioxidante. El antioxidante incluido en las coformulaciones estables se selecciona de entre, pero sin limitación, cisteína, triptófano y metionina. En una coformulación estable ejemplar, el antioxidante es metionina. El antioxidante en las coformulaciones estables se encuentra a una concentración de de entre o de entre aproximadamente 5 mM a 50 mM, 5 mM a 40 mM, 5 mM a 20 mM o 10 mM a 20 mM, incluidos. En un ejemplo, el antioxidante es metionina y la concentración de metionina es de entre o aproximadamente entre 10 mM a 20 mM.

Las coformulaciones estables contienen opcionalmente cinc. Por ejemplo, la insulina de acción rápida puede ser insulina regular, insulina lispro o insulina aspart y la formulación contiene cinc. El cinc en las coformulaciones estables se selecciona de entre, pero sin limitación, óxido de cinc, acetato de cinc o cloruro de cinc, y está presente a una concentración de entre o aproximadamente entre 0,001 a 0,1 mg por 100 unidades de insulina (mg/100 U), 0,001 a 0,05 mg/100 U o 0,01 a 0,05 mg/100 U.

Las coformulaciones estables contienen opcionalmente un compuesto nicotínico, que se selecciona de entre, pero sin limitación, nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida, vitamina B3 y/o sales de los mismos y/o cualquier combinación de los mismos. Los compuestos nicotínicos están presentes en una concentración de o de aproximadamente de 1 mM a 150 mM, 10 mM a 150 mM, 50 mM a 100 mM o de o de aproximadamente 80 mM.

Las coformulaciones estables contienen opcionalmente uno o más aminoácidos, seleccionados de entre, pero sin limitación, arginina, ácido glutámico, y/o sales de los mismos y/o combinaciones de los mismos. Los aminoácidos están presentes a una concentración de 1 a 100 mM, 10 a 100 mM, o de o de aproximadamente 30 mM, 50 mM u 80 mM.

Una coformulación estable tiene un pH de entre o aproximadamente entre 7,0 a 7,6, y contiene una enzima degradante de hialuronano que es un PH20 en una cantidad de entre o aproximadamente entre 100 u/ml a 1000 U/ml, incluidos; un análogo de insulina de acción rápida en una cantidad de entre o aproximadamente entre 10 U/ml a 1000 U/ml, incluidos; un agente tamponador Tris a una concentración de entre o aproximadamente entre 10 mM a 50 mM, incluidos; NaCl a una concentración de entre o de aproximadamente entre 50 a 200 mM, incluidos; metionina a una concentración entre o de aproximadamente entre 5 mM a 50 mM, incluidos; glicerina a una concentración de entre o de aproximadamente entre 0 mM a 50 mM, incluidos; un tensioactivo que es poloxamer 188, polisorbato 20 o polisorbato 80 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,5 %; y un conservante que contiene fenol a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,1 % al 0,25 % y m-cresol a un % en p/v de entre o entre aproximadamente el 0,05 % al 0,2 %. En otro ejemplo, esta coformulación estable ejemplar contiene además

cinc a una concentración de 0,001 a 0,1 mg por 100 unidades de insulina (mg/100 U). En un ejemplo, los conservantes en las coformulaciones estables se encuentran al o aproximadamente al 0,1 % de fenol y 0,015 % de m-cresol, 0,125 % de fenol y 0,075 % de m-cresol, 0,13 % de fenol y 0,075 % de m-cresol, 0,13 % de fenol y 0,08 % de m-cresol o 0,17 % de fenol y 0,13 % de m-cresol.

5 Una coformulación estable tiene un pH de entre o de aproximadamente entre 7,0 a 7,6 contiene una insulina de acción rápida que es insulina lispro en una cantidad de entre o de aproximadamente entre 10 U/ml a 1000 U/ml, incluidos; una enzima degradante de hialuronano que es un PH20 en una cantidad de entre o aproximadamente entre 100 u/ml a 1000 U/ml, incluidos; un agente tamponador Tris a una concentración de entre o aproximadamente entre 25 mM a 35 mM, incluidos; NaCl a una concentración de entre o de aproximadamente entre 50 mM a 120 mM, incluidos; metionina a una concentración entre o de aproximadamente entre 10 mM a 30 mM, incluidos; glicerina a una concentración de entre o de aproximadamente entre 40 mM a 60 mM, incluidos; un tensioactivo que es poloxamer 188, polisorbato 20 o polisorbato 80 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,05 %, incluidos; cinc a una concentración de 0,017 a 0,024 mg por 100 unidades de insulina (mg/100 U); y un conservante (o conservantes) que contiene un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,08 % al 0,17 % de fenol, incluido, y entre o aproximadamente el 0,07 % al 0,17 % de m-cresol. En un ejemplo, la concentración de NaCl es de entre o de entre aproximadamente 70 mM a 100 mM. En otro ejemplo, el pH es o es de aproximadamente $7,1 \pm 0,2$, $7,2 \pm 0,2$, $7,3 \pm 0,2$ o $7,4 \pm 0,2$. En un ejemplo, los conservantes en las coformulaciones estables se encuentran al o aproximadamente al 0,1 % de fenol y 0,015 % de m-cresol, 0,125 % de fenol y 0,075 % de m-cresol, 0,13 % de fenol y 0,075 % de m-cresol, 0,13 % de fenol y 0,08 % de m-cresol o 0,17 % de fenol y 0,13 % de m-cresol.

25 Una coformulación estable tiene un pH de entre o de aproximadamente entre 7,0 a 7,6 contiene una insulina de acción rápida que es insulina aspart en una cantidad de entre o de aproximadamente entre 10 U/ml a 1000 U/ml, incluidos; una enzima degradante de hialuronano que es un PH20 en una cantidad de entre o aproximadamente entre 100 u/ml a 1000 U/ml, incluidos; un agente tamponador Tris a una concentración de entre o aproximadamente entre 25 mM a 35 mM, incluidos; NaCl a una concentración de entre o de aproximadamente entre 80 mM a 160 mM, incluidos; metionina a una concentración entre o de aproximadamente entre 10 mM a 30 mM, incluidos; glicerina a una concentración de entre o de aproximadamente entre 20 mM a 50 mM, incluidos; un tensioactivo que es poloxamer 188, polisorbato 20 o polisorbato 80 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,05 %, incluidos; cinc a una concentración de 0,017 a 0,024 mg por 100 unidades de insulina (mg/100 U); y un conservante (o conservantes) que contiene un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,08 % al 0,17 % de fenol, incluido, y entre o aproximadamente el 0,07 % al 0,17 % de m-cresol. En un ejemplo, la concentración de NaCl es de o es de entre aproximadamente 70 mM a 100 mM. En otro ejemplo, el pH es o es de aproximadamente $7,2 \pm 0,2$, $7,3 \pm 0,2$, $7,4 \pm 0,2$ o $7,5 \pm 0,2$. En un ejemplo, los conservantes en las coformulaciones estables se encuentran al o aproximadamente al 0,1 % de fenol y 0,015 % de m-cresol, 0,125 % de fenol y 0,075 % de m-cresol, 0,13 % de fenol y 0,075 % de m-cresol, 0,13 % de fenol y 0,08 % de m-cresol o 0,17 % de fenol y 0,13 % de m-cresol.

40 Una coformulación estable tiene un pH de entre o de aproximadamente entre 7,0 a 7,6 contiene una insulina de acción rápida que es insulina glulisina en una cantidad de entre o de aproximadamente entre 10 U/ml a 1000 U/ml, incluidos; una enzima degradante de hialuronano que es un PH20 en una cantidad de entre o aproximadamente entre 100 u/ml a 1000 U/ml, incluidos; un agente tamponador Tris a una concentración de entre o aproximadamente entre 25 mM a 35 mM, incluidos; NaCl a una concentración de entre o de aproximadamente entre 80 mM a 200 mM, incluidos; metionina a una concentración entre o de aproximadamente entre 10 mM a 30 mM, incluidos; glicerina a una concentración de entre o de aproximadamente entre 40 mM a 60 mM, incluidos; un tensioactivo que es poloxamer 188 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,05 %, incluidos; y un conservante (o conservantes) que tiene un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,08 % al 0,17 % de fenol, incluido, y entre o aproximadamente el 0,07 % al 0,17 % de m-cresol. En un ejemplo, la concentración de NaCl es de entre o de entre aproximadamente 100 mM a 150 mM. En otro ejemplo, el pH es o es de aproximadamente $7,2 \pm 0,2$, $7,3 \pm 0,2$, $7,4 \pm 0,2$ o $7,5 \pm 0,2$.

55 En un ejemplo, el PH20 en las coformulaciones estables es un PH20 humano que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 1, o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. Por ejemplo, el polipéptido PH20 tiene 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 la SEQ ID NO: 1, o es una variante del mismo que muestra al menos un 85 %, 90 % o 95 % 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 la SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. En otro ejemplo, el polipéptido PH20 tiene una secuencia de aminoácidos que contiene un truncamiento C-terminal después de la posición de aminoácidos 482 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o es una variante del

mismo que muestra al menos un 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que contiene un truncamiento C-terminal después de la posición de aminoácidos 482 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. En una coformulación estable ejemplar, el polipéptido de PH20 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9. La enzima degradante de hialuronano o PH20 en las coformulaciones estables pueden producirse y expresarse a partir de células de mamífero, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO). En un ejemplo particular, el PH20 se denomina rHuPH20.

Las coformulaciones estables pueden formularse para su administración multidosis. El volumen de las coformulaciones estables puede ser de entre o aproximadamente entre 0,5 ml a 50 ml, 1 ml a 40 ml, 1 ml a 20 ml, 1 ml a 10 ml, o 3 ml a 10 ml, incluidos. Las coformulaciones estables pueden formularse para su administración usando un vial, jeringa, bolígrafo, reservorio para una bomba o un sistema de bucle cerrado. En un ejemplo particular, las coformulaciones estables se formulan para su administración usando una infusión continua subcutánea de insulina que se proporciona mediante un sistema de bucle cerrado.

Las coformulaciones pueden proporcionarse en jeringuillas o viales, un sistema de bucle cerrado, una bomba de insulina, y/o un bolígrafo de insulina.

Se describen métodos en los que se administran las coformulaciones estables. Por ejemplo, en el presente documento se describen métodos para tratar la diabetes mediante la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una coformulación estable descrita en el presente documento. La diabetes que se va a tratar incluye diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 o diabetes gestacional. También se describen en el presente documento métodos para controlar los niveles de glucosa en sangre en un sujeto mediante la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una coformulación estable descrita en el presente documento. En la práctica de los métodos del presente documento, las coformulaciones estables se administran por vía subcutánea o por vía intraperitoneal, por ejemplo, mediante una jeringuilla o bolígrafo de insulina o mediante infusión subcutánea continua. En la práctica de los métodos del presente documento, las coformulaciones estables pueden administrarse antes de una comida como terapia de insulina prandial. En los métodos, la coformulación estable puede administrarse usando un método de administración para lograr la infusión de insulina subcutánea continua, tal como mediante una bomba de insulina o un sistema de bucle cerrado. En algunos casos, los métodos incluyen administrar otro fármaco contra la diabetes, que se selecciona de entre, pero sin limitación, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, tiazolidindionas, inhibidores de alfa-glucosidasa, análogos peptídicos, incluyendo análogos del péptido similar a glucagón (GLP) y análogos del péptido inhibidor gástrico (GIP) e inhibidores de DPP-4.

También se proporcionan en el presente documento composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, en donde la enzima degradante de hialuronano es una hialuronidasa, y lisil lisina (Lys-Lys) en una cantidad para hacer que la enzima degradante de hialuronano sea estable. En algunos ejemplos, la concentración de Lys-Lys es de entre o de aproximadamente entre 5 mM a 120 mM, 10 mM a 100 mM, 10 mM a 50 mM, 30 mM a 110 mM, 30 mM a 80 mM, 50 mM a 100 mM o 100 mM a 120 mM. En otros ejemplos, la concentración de Lys-Lys es de al menos o de al menos aproximadamente o de 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM o 120 mM. EN el presente documento se proporcionan composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y lisil lisina (Lys-Lys) en una cantidad suficiente, de tal forma que la enzima degradante de hialuronano retiene al menos el 50 % de la actividad inicial de hialuronidasa durante al menos tres (3) días a 37 °C. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano retiene al menos un 50 % de la actividad de hialuronidasa inicial a 37 °C durante al menos 4 días, 5 días, 6 días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más. En un ejemplo particular, la enzima degradante de hialuronano retiene al menos un 50 % de la actividad inicial de hialuronidasa durante al menos un mes a 37 °C. En otros ejemplos, la enzima degradante de hialuronano retiene al menos un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de la actividad de hialuronidasa inicial.

En algunos ejemplos de las composiciones proporcionadas, el pH de la formulación es de entre o de aproximadamente entre 6,5 a 8,0, 6,5 a 7,4, 6,8 a 7,8, 7,0 a 7,6 o 6,8 a 7,2, incluidos. Por ejemplo, el pH de la formulación es o es de aproximadamente o de al menos $6,5 \pm 0,2$, $6,6 \pm 0,2$, $6,7 \pm 0,2$, $6,8 \pm 0,2$, $6,9 \pm 0,2$, $7,0 \pm 0,2$, $7,1 \pm 0,2$, $7,2 \pm 0,2$, $7,3 \pm 0,2$, $7,4 \pm 0,2$, $7,5 \pm 0,2$, $7,6 \pm 0,2$, $7,7 \pm 0,2$ o $7,8 \pm 0,2$.

Cualquiera de las composiciones proporcionadas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y lisil lisina (Lys-Lys) puede contener además un agente estabilizante. Por ejemplo, las composiciones pueden contener un agente estabilizante que se selecciona de entre un aminoácido, un derivado de aminoácido, una amina, un azúcar, un poliol, una sal y un tensioactivo. En algunos ejemplos, el agente estabilizante es un tensioactivo y la cantidad de tensioactivo, como un % de concentración en masa (p/v) en la formulación, es de entre o aproximadamente entre el 0,0005 % al 1,0 %, del 0,0005 % al 0,005 %, del 0,001 % al 0,01 %, del 0,01 % al 0,5 %, del 0,01 % al 0,1 %, del 0,01 % al 0,05 %, o del 0,01 % al 0,02 %, incluidos. En otros ejemplos, el agente estabilizante es un tensioactivo y la cantidad de tensioactivo, como un % de concentración en masa (p/v) en la formulación, es o es de aproximadamente o de al menos el 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,015 %;

0,02 %; 0,025 %; 0,03 %; 0,035 %; 0,04 %; 0,045 %; 0,05 %; 0,055 %; 0,06 %; 0,065 %; 0,07 %; 0,08 % o 0,9 %. El tensioactivo puede seleccionarse de entre un propilenglicol, polietilenglicol, glicerina, sorbitol, poloxamer y polisorbato. En un ejemplo particular, el tensioactivo se selecciona de entre poloxamer 188, polisorbato 20 y polisorbato 80.

5 En algunos ejemplos, las composiciones proporcionadas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y lisil lisina (Lys-Lys) también contienen un antioxidante. Por ejemplo, las composiciones contienen un antioxidante que se selecciona de entre cisteína, triptófano y metionina. En un ejemplo particular, el antioxidante es metionina. En algunos ejemplos, el antioxidante está presente a una concentración de entre o desde aproximadamente entre 5 mM a 50 mM, 5 mM a 40 mM, 5 mM a 20 mM o 10 mM a 20 mM, incluidos. En otros ejemplos, el antioxidante está presente a una concentración que es o es de aproximadamente o es de al menos 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM.

15 En algunos ejemplos, las composiciones proporcionadas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y lisil lisina (Lys-Lys) también contienen un modificador de la tonicidad para mantener la osmolaridad entre o aproximadamente entre 245 mOsm/kg a 500 mOsm/kg, incluidos. En algunos ejemplos, las composiciones contienen un modificador de la tonicidad para mantener la osmolaridad de la formulación a aproximadamente o al menos aproximadamente 245 mOsm/kg, 250 mOsm/kg, 255 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 265 mOsm/kg, 270 mOsm/kg, 275 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 285 mOsm/kg, 290 mOsm/kg, 300 mOsm/kg, 350 mOsm/kg, 400 mOsm/kg, 450 mOsm/kg o 500 mOsm/kg. En algunos ejemplos, el modificador de la tonicidad se selecciona de entre glicerina, NaCl, aminoácidos, polialcoholes o trehalosa. En un ejemplo particular, el modificador de la tonicidad es NaCl y la concentración de NaCl es o es de aproximadamente 20 mM a 200 mM, 40 mM a 160 mM, 80 mM a 120 mM, 20 mM a 80 mM o 50 mM a 150 mM, incluidos. En otros ejemplos, el modificador de la tonicidad es NaCl y la concentración de NaCl es de 0 mM a 150 mM, 10 mM a 50 mM, 50 mM a 100 mM y 100 mM a 130 mM. En algunos ejemplos, el NaCl está a una concentración de menos de 150 mM, menos de 140 mM, menos de 130 mM, menos de 120 mM, menos de 110 mM, menos de 100 mM, menos de 90 mM, menos de 80 mM, menos de 70 mM, menos de 60 mM, menos de 50 mM, menos de 40 mM, menos de 30 mM, menos de 20 mM, menos de 10 mM, o menos.

30 Cualquiera de las composiciones proporcionadas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y lisil lisina (Lys-Lys) también pueden contener una cantidad suficiente de un agente tamponador para mantener el intervalo de pH a entre o aproximadamente entre 6,5 a 8,0, 6,8 a 7,8, o 7,0 a 7,6, 6,5 a 7,2, 6,8 a 7,4, incluidos. En algunos ejemplos, el agente tamponador se selecciona entre Tris, histidina, fosfato y citrato. En un ejemplo particular, el agente tamponador es un fosfato que es fosfato de sodio. En otro ejemplo particular, el agente tamponador es Tris. En algunos ejemplos, la concentración del agente tamponador en las composiciones es de entre o es de entre aproximadamente 1 mM a 100 mM, 10 mM a 80 mM, 5 mM a 50 mM o 20 mM a 40 mM, incluidos.

40 La enzima degradante de hialuronano en cualquiera de las composiciones proporcionadas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y lisil lisina (Lys-Lys) es una hialuronidasa. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano es una hialuronidasa que es activa a pH neutro. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano carece de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) o no está asociado a membrana cuando se expresa a partir de una célula. En otros ejemplos, la enzima degradante de hialuronano es una enzima degradante de hialuronano que contiene truncamientos C-terminales de uno o más restos de aminoácidos para eliminar la totalidad o parte de un anclaje de GPI.

En otros ejemplos de las composiciones proporcionadas, la enzima degradante de hialuronano es una hialuronidasa que es una PH20 o un fragmento truncado en C-terminal de la misma. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano es una PH20 que es una PH20 humana o no humana. En algunos ejemplos, la PH20 tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de la SEQ ID NO: 1, o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 % con una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. Por ejemplo, la PH20 tiene al menos un 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 SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. En algunos ejemplos de las composiciones, la enzima degradante de hialuronano es un polipéptido de PH20 que tiene 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 la SEQ ID NO: 1, o es una variante del mismo que muestra una identidad de secuencia de al menos el 85 % 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 la SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. En ejemplos particulares, la enzima degradante de hialuronano es una PH20 truncada en C-terminal que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9.

- En algunos ejemplos de las composiciones proporcionadas, la cantidad de una enzima degradante de hialuronano es de entre o aproximadamente de entre 10 U/ml a 5000 U/ml, 50 U/ml a 4000 U/ml, 100 U/ml a 2000 U/ml, 300 U/ml a 2000 U/ml, 600 U/ml a 2000 U/ml, 100 U/ml a 1000 U/ml, 200 U/ml a 800 U/ml, 100 U/ml a 500 U/ml, o 150 U/ml a 300 U/ml, incluidos. Por ejemplo, la cantidad de una enzima degradante de hialuronano es de al menos o es de aproximadamente o es de 30 U/ml, 35 U/ml, 40 U/ml, 45 U/ml, 50 U/ml, 55 U/ml, 60 U/ml, 65 U/ml, 70 U/ml, 75 U/ml, 80 U/ml, 85 U/ml, 90 U/ml, 95 U/ml, 100 U/ml, 105 U/ml, 110 U/ml, 115 U/ml, 120 U/ml, 125 U/ml, 130 U/ml, 135 U/ml, 140 U/ml, 145 U/ml, 150 U/ml, 155 U/ml, 160 U/ml, 170 U/ml, 180 U/ml, 190 U/ml, 200 U/ml, 250 U/ml, 300 U/ml, 350 U/ml, 400 U/ml, 450 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 700 U/ml, 800 U/ml, 900 U/ml, 1000 U/ml o 2000 U/ml.
- En algunos ejemplos de las composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y lisil lisina (Lys-Lys), la concentración de Lys-Lys es de 5 mM a 50 mM, incluidos. Por ejemplo, la concentración de Lys-Lys es de al menos 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM o 50 mM; y/o es menor de 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM o 10 mM.
- En el presente documento se proporcionan composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y lisil lisina (Lys-Lys) en donde el pH de la composición es de entre o aproximadamente entre 6,5 a 7,2 y la composición contiene una enzima degradante de hialuronano en una cantidad que es de entre o aproximadamente entre 100 U/ml a 500 U/ml, incluidos; Lys-Lys a una concentración que es de entre o de aproximadamente entre 5 mM a 30 mM, incluidos; NaCl a una concentración menor de 140 mM de NaCl; un tensioactivo que es polisorbato 80 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,05 %, incluidos; metionina a una concentración que es de entre o de aproximadamente entre 5 mM a 20 mM, incluidos; y fosfato de sodio a una concentración que es de entre o aproximadamente entre 5 mM a 50 mM, incluidos. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano es una PH20 o un fragmento truncado en C-terminal de la misma.
- En algunos ejemplos, el volumen de las composiciones proporcionadas es de entre o aproximadamente entre 0,5 ml a 50 ml, 1 ml a 40 ml, 1 ml a 20 ml, 1 ml a 10 ml, o 3 ml a 10 ml, incluidos. Las composiciones pueden formularse para su administración usando un vial, jeringa, bolígrafo, reservorio para una bomba o un sistema de bucle cerrado. También se proporciona en el presente documento una jeringuilla o vial que contiene cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento.
- También se proporcionan en el presente documento composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, lisil lisina (Lys-Lys) en una cantidad para hacer que la enzima degradante de hialuronano sea estable y una insulina de acción rápida. En algunos ejemplos, la concentración de Lys-Lys es de 30 mM a 120 mM, 50 mM a 105 mM o 80 mM a 100 mM, incluidos. En las composiciones proporcionadas, la insulina de acción rápida puede ser monomérica, dimérica o hexamérica. En algunos ejemplos, la insulina de acción rápida es una insulina humana de acción rápida. En otros ejemplos, la insulina de acción rápida es una insulina regular. En un ejemplo particular, la insulina de acción rápida es una insulina regular que es una insulina humana o insulina de cerdo. En algunos ejemplos, la insulina de acción es una insulina regular que es una insulina con una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 103 y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 104 o una insulina con una cadena A con una secuencia de aminoácidos expuesta como las posiciones de restos de aminoácidos 88-108 de SEQ ID NO: 123 y una cadena B con una secuencia de aminoácidos expuesta como las posiciones de restos de aminoácidos 25-54 de SEQ ID NO: 123. En otros ejemplos más de las composiciones proporcionadas, la insulina de acción rápida es una insulina recombinante. La insulina de acción rápida puede ser sintética o parcialmente sintética. En algunos ejemplos, la insulina está aislada.
- En otros ejemplos de las composiciones proporcionadas, la insulina de acción rápida es un análogo de insulina. En algunos ejemplos, el análogo de insulina se selecciona de entre insulina aspart, insulina lispro e insulina glulisina. Por ejemplo, el análogo de insulina se selecciona de entre una insulina que tiene una cadena A con una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 103 y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 147-149. En cualquiera de las composiciones proporcionadas, la insulina de acción rápida puede estar presente en una cantidad de entre o de aproximadamente entre 10 U/ml a 1000 U/ml, 20 U/ml a 500 U/ml, 50 U/ml a 300 U/ml o 200 U/ml a 800 U/ml, incluidos. Por ejemplo, la cantidad de insulina de acción rápida es de al menos o es de aproximadamente o es de 10 U/ml, 20 U/ml, 30 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 250 U/ml, 300 U/ml, 350 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 700 U/ml, 800 U/ml, 900 U/ml o 1000 U/ml.
- En ejemplos particulares de las composiciones proporcionadas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, lisil lisina (Lys-Lys) en una cantidad para hacer que la enzima degradante de hialuronano sea estable y una insulina de acción rápida, la insulina de acción rápida es un análogo de insulina y la enzima degradante de hialuronano es una PH20 o un fragmento truncado en C-terminal de la misma. En un ejemplo particular, la insulina de acción rápida es un análogo de insulina que es glulisina y la concentración de Lys-Lys es de 50 a 105 mM. En otro ejemplo, la insulina de acción rápida es un análogo de insulina que es insulina aspart o insulina lispro y la concentración de Lys-Lys es de 80 a 100 mM.

Cualquiera de las composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, lisil lisina (Lys-Lys) en una cantidad para hacer que la enzima degradante de hialuronano sea estable y una insulina de acción rápida proporcionada en el presente documento puede ser para administración de una sola dosis o para una administración de múltiples dosis. En los ejemplos donde la composición es para la administración de múltiples dosis, la composición contiene una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante o mezcla de conservantes. El conservante (o los conservantes) en la formulación puede contener uno o más de un conservante (o conservantes) fenólico, un conservante no fenólico (o conservantes no fenólicos) o un conservante fenólico (o conservantes fenólicos) y un conservante no fenólico (o conservantes no fenólicos). En algunos ejemplos, el conservante (o conservantes) se selecciona de entre fenol, m-cresol, el metilparabeno, alcohol bencílico, timerosal, cloruro de benzalconio, 4-cloro-1-butanol, diclorhidrato de clorhexidina, digluconato de clorhexidina, L-fenilalanina, EDTA, bronopol, acetato fenilmercúrico, glicerol, imidourea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, o-cresol, p-cresol, clorocresol, cetrimida, cloruro de bencetonio, etil parabeno, propil parabeno, butil parabeno y cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos de las composiciones proporcionadas para administración de múltiples dosis, la formulación contiene un solo conservante. En otros ejemplos de las composiciones proporcionadas para administración de múltiples dosis, la formulación contiene una mezcla de conservantes que contiene 2, 3 o 4 conservantes diferentes. En algunos ejemplos, las composiciones contienen al menos un conservante fenólico. En otros ejemplos, el o los conservantes son fenol, m-cresol o fenol y m-cresol.

En algunos ejemplos de las composiciones proporcionadas, la cantidad total de los uno o más agentes conservantes como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) en la formulación es de o es de entre un 0,1 % y un 0,4 %, del 0,1 % al 0,3 %, del 0,15 % al 0,325 %, del 0,15 % al 0,25 %, del 0,1 % al 0,2 %, del 0,2 % al 0,3 % o del 0,3 % al 0,4 %, incluidos. En ejemplos particulares de las composiciones proporcionadas en donde los conservantes son fenol y m-cresol, la cantidad como % de concentración en masa (p/v) en la formulación es de entre o aproximadamente de entre el 0,1 % al 0,25 % de fenol y entre o aproximadamente entre el 0,05 % al 0,2 % de m-cresol, es de entre o aproximadamente entre el 0,10 % al 0,2 % de fenol y de entre o aproximadamente entre el 0,06 % al 0,18 % de tricresol, es de entre o aproximadamente entre el 0,1 % al 0,15 % de fenol y del 0,08 % al 0,15 % de m-cresol, es de entre o aproximadamente entre el 0,10 % al 0,15 % de fenol y entre o aproximadamente entre el 0,06 al 0,09 % de m-cresol o es de entre o aproximadamente entre el 0,12 % al 0,18 % de fenol y entre o aproximadamente entre el 0,14 al 0,22 % de m-cresol, incluidos. En otros ejemplos particulares de las composiciones proporcionadas en donde los conservantes son fenol y m-cresol, la cantidad como % de concentración en masa (p/v) en la formulación es de o es de aproximadamente el 0,1 % de fenol y el 0,075 % de m-cresol, es del o es aproximadamente del 0,1 % de fenol y del 0,15 % de m-cresol, es del o es aproximadamente del 0,125 % de fenol y del 0,075 % de m-cresol, es del o es aproximadamente del 0,13 % de fenol y del 0,075 % de m-cresol, es del o es aproximadamente del 0,13 % de fenol y del 0,08 % de m-cresol, es del o es aproximadamente del 0,15 % de fenol y del 0,175 % de m-cresol o es del o es de aproximadamente el 0,17 % de fenol y del 0,13 % de m-cresol.

En el presente documento se proporcionan composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, lisil lisina (Lys-Lys) en una cantidad para hacer que la enzima degradante de hialuronano sea estable y una insulina de acción rápida en donde el pH de la composición es de entre o aproximadamente entre 6,8 a 7,4; y la composición contiene una enzima degradante de hialuronano que es un PH20 en una cantidad de entre o aproximadamente entre 100 u/ml a 1000 U/ml, incluidos; un análogo de insulina de acción rápida que es insulina glulisina en una cantidad de entre o aproximadamente entre 10 U/ml a 1000 U/ml, incluidos; Lys-Lys a una concentración de entre o de aproximadamente entre 50 mM a 105 mM, incluidos; NaCl a una concentración de menos de 100 mM; un tensioactivo que es polisorbato 20 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,0005 % al 0,005 %, incluidos; metionina a una concentración entre o de aproximadamente entre 5 mM a 20 mM, incluidos; y un conservante que contiene fenol a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,1 % al 0,25 % y m-cresol a un % en p/v de entre o entre aproximadamente el 0,05 % al 0,2 %.

En el presente documento se proporcionan composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, lisil lisina (Lys-Lys) en una cantidad para hacer que la enzima degradante de hialuronano sea estable y una insulina de acción rápida en donde el pH de la composición es de entre o aproximadamente entre 6,8 a 7,4; y la composición contiene una enzima degradante de hialuronano que es un PH20 en una cantidad de entre o aproximadamente entre 100 u/ml a 1000 U/ml, incluidos; un análogo de insulina de acción rápida que es insulina aspart o insulina lispro en una cantidad de entre o aproximadamente entre 10 U/ml a 1000 U/ml, incluidos; Lys-Lys a una concentración de entre o de aproximadamente entre 80 mM a 100 mM, incluidos; NaCl a una concentración de menos de 30 mM; un tensioactivo que es polisorbato 20 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,0005 % al 0,005 %, incluidos; metionina a una concentración entre o de aproximadamente entre 5 mM a 20 mM, incluidos; y un conservante que contiene fenol a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,1 % al 0,25 % y m-cresol a un % en p/v de entre o entre aproximadamente el 0,05 % al 0,2 %.

En algunos ejemplos, el volumen de las composiciones proporcionadas es de entre o aproximadamente entre 0,5 ml a 50 ml, 1 ml a 40 ml, 1 ml a 20 ml, 1 ml a 10 ml, o 3 ml a 10 ml, incluidos. Las composiciones pueden formularse para su administración usando un vial, jeringa, bolígrafo, reservorio para una bomba o un sistema de bucle cerrado.

En algunos ejemplos, las composiciones se formulan para su administración usando una infusión subcutánea continua de insulina. También se proporciona en el presente documento una jeringuilla o vial que contiene cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento.

- 5 En el presente documento se describen composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y $MgCl_2$ en una cantidad suficiente de tal modo que la enzima degradante de hialuronano retiene al menos un 50 % de la actividad inicial de hialuronidasa durante al menos tres (3) días a 37 °C. En algunos ejemplos, las composiciones contienen $MgCl_2$ a una concentración que es de entre o de aproximadamente entre 50 mM a 150 mM, 75 mM a 125 mM o 80 mM a 100 mM, incluidos. Por ejemplo, las
10 composiciones contienen $MgCl_2$ a una concentración que es al menos de o es de aproximadamente o es de 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM o 150 mM. En algunos ejemplos de las composiciones, la enzima degradante de hialuronano retiene al menos un 50 % de la actividad de hialuronidasa inicial a 37 °C durante al menos 4 días, 5 días, 6 días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más. Por ejemplo, la enzima degradante de
15 hialuronano retiene al menos un 50 % de la actividad inicial de hialuronidasa durante al menos un mes a 37 °C, tal como al menos un 60 %, 70 %; 75 %; 80 %; 85 %; 90 %; 95 % o más de la actividad de hialuronidasa inicial.

- Las composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y $MgCl_2$ pueden tener un pH que es de entre o de aproximadamente entre 6,5 a 8,0, 6,5 a 7,4, 6,8 a 7,8, 7,0 a 7,6 o
20 6,8 a 7,2. En algunos ejemplos, el pH de la composición es o es de aproximadamente o de al menos 6,5 ± 0,2, 6,6 ± 0,2, 6,7 ± 0,2, 6,8 ± 0,2, 6,9 ± 0,2, 7,0 ± 0,2, 7,1 ± 0,2, 7,2 ± 0,2, 7,3 ± 0,2, 7,4 ± 0,2, 7,5 ± 0,2, 7,6 ± 0,2, 7,7 ± 0,2 o 7,8 ± 0,2. Las composiciones pueden contener además un agente estabilizante que se selecciona de entre un aminoácido, un derivado de aminoácido, una amina, un azúcar, un poliol, una sal y un tensioactivo. En algunos
25 ejemplos, el agente estabilizante es un tensioactivo y la cantidad de tensioactivo, como un % de concentración en masa (p/v) en la formulación, es de entre o aproximadamente entre el 0,0005 % al 1,0 %, del 0,0005 % al 0,005 %, del 0,001 % al 0,01 %, del 0,01 % al 0,5 %, del 0,01 % al 0,1 %, del 0,01 % al 0,05 % o del 0,01 % al 0,02 %, incluidos. Por ejemplo, el agente estabilizante es un tensioactivo y la cantidad de tensioactivo, como un % de
30 concentración en masa (p/v) en la formulación, es o es de aproximadamente o de al menos el 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,015 %, 0,02 %, 0,025 %, 0,03 %, 0,035 %, 0,04 %, 0,045 %, 0,05 %, 0,055 %, 0,06 %, 0,065 %, 0,07 %, 0,08 % o 0,9 %. En algunos ejemplos, el tensioactivo se selecciona de entre un propilenglicol, polietilenglicol, glicerina, sorbitol, poloxamer y polisorbato. En ejemplos particulares, el tensioactivo se selecciona de entre poloxamer 188, polisorbato 20 y polisorbato 80.

- En algunos ejemplos, las composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de enzima degradante de hialuronano y $MgCl_2$ contienen un antioxidante que se selecciona de entre cisteína, triptófano y metionina. En
35 ejemplos particulares, el antioxidante es metionina. En algunos ejemplos, el antioxidante se encuentra a una concentración de entre o desde aproximadamente entre 5 mM a 50 mM, 5 mM a 40 mM, 5 mM a 20 mM o 10 mM a 20 mM, incluidos. Por ejemplo, el antioxidante es metionina y la concentración es o es de aproximadamente o es de al menos 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM.

- 40 En algunos ejemplos, las composiciones contienen una cantidad suficiente de un agente tamponador para mantener el intervalo de pH a entre o entre aproximadamente 6,5 a 8,0, 6,8 a 7,8, 7,0 a 7,6, 6,5 a 7,2 o 6,8 a 7,4. En algunos ejemplos, el agente tamponador se selecciona entre Tris, histidina, fosfato y citrato. En un ejemplo particular, el agente tamponador es clorhidrato de histidina. La concentración del agente tamponador en las composiciones puede
45 ser de entre o entre aproximadamente 1 mM a 100 mM, 10 mM a 80 mM, 5 mM a 50 mM o 20 mM a 40 mM.

- En algunos ejemplos, las composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y $MgCl_2$ contienen una enzima degradante de hialuronano que es una hialuronidasa o una condroitinasa. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano es una hialuronidasa que es activa a
50 pH neutro. En otros ejemplos, la enzima degradante de hialuronano carece de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) o no está asociado a membrana cuando se expresa a partir de una célula. Por ejemplo, la enzima degradante de hialuronano es una enzima degradante de hialuronano que contiene truncamientos C-terminales de uno o más restos de aminoácidos para eliminar la totalidad o parte de un anclaje de GPI.

- 55 En otros ejemplos, la enzima degradante de hialuronano es una hialuronidasa que es una PH20 o un fragmento truncado en C-terminal de la misma. La PH20 puede ser una PH20 humana o no humana. En algunos ejemplos de las composiciones, la PH20 tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de la SEQ ID NO: 1, o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 % con una secuencia de aminoácidos que contiene al menos los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 1 y retiene
60 actividad de hialuronidasa. Por ejemplo, la PH20 tiene al menos un 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 SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. En otros ejemplos, el polipéptido PH20 tiene una secuencia de aminoácidos que contiene un truncamiento C-terminal después de la
65 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 la SEQ ID NO: 1, o es una variante del mismo que muestra una identidad de secuencia de

al menos el 85 % 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 la SEQ ID NO: 1 y retiene actividad de hialuronidasa. En ejemplos particulares, la enzima degradante de hialuronano es una PH20 truncada en C-terminal que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9.

En algunos ejemplos, las composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y $MgCl_2$ contienen una enzima degradante de hialuronano en una cantidad que es de entre o entre aproximadamente 10 U/ml a 5000 U/ml, 50 U/ml a 4000 U/ml, 100 U/ml a 2000 U/ml, 300 U/ml a 2000 U/ml, 600 U/ml a 2000 U/ml, 100 U/ml a 1000 U/ml, 200 U/ml a 800 U/ml, 100 U/ml a 500 U/ml, o 150 U/ml a 300 U/ml, incluidos. Por ejemplo, las composiciones contienen una enzima degradante de hialuronano en una cantidad que es de al menos o es de aproximadamente o es de 30 U/ml, 35 U/ml, 40 U/ml, 45 U/ml, 50 U/ml, 55 U/ml, 60 U/ml, 65 U/ml, 70 U/ml, 75 U/ml, 80 U/ml, 85 U/ml, 90 U/ml, 95 U/ml, 100 U/ml, 105 U/ml, 110 U/ml, 115 U/ml, 120 U/ml, 125 U/ml, 130 U/ml, 135 U/ml, 140 U/ml, 145 U/ml, 150 U/ml, 155 U/ml, 160 U/ml, 170 U/ml, 180 U/ml, 190 U/ml, 200 U/ml, 250 U/ml, 300 U/ml, 350 U/ml, 400 U/ml, 450 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 700 U/ml, 800 U/ml, 900 U/ml, 1000 U/ml o 2000 U/ml.

En el presente documento se describen composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano y $MgCl_2$ en donde el pH de la composición es de entre o entre aproximadamente 6,5 a 7,2 y la composición contiene una enzima degradante de hialuronano en una cantidad que es de entre o entre aproximadamente 100 U/ml a 500 U/ml, incluidos; $MgCl_2$ a una concentración que es de entre o de aproximadamente entre 50 mM a 150 mM, incluidos; un tensioactivo que es polisorbato 80 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,05 %, incluidos; metionina a una concentración que es de entre o de aproximadamente entre 5 mM a 20 mM, incluidos; e histidina/HCl a una concentración que es de entre o de aproximadamente entre 5 mM a 50 mM, incluidos.

En algunos ejemplos, el volumen de las composiciones es de entre o aproximadamente entre 0,5 ml a 50 ml, 1 ml a 40 ml, 1 ml a 20 ml, 1 ml a 10 ml, o 3 ml a 10 ml, incluidos. Las composiciones pueden formularse para su administración usando un vial, jeringa, bolígrafo, reservorio para una bomba o un sistema de bucle cerrado. También se describe en el presente documento una jeringuilla o vial que contiene cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento.

Las composiciones descritas en el presente documento que contienen una insulina, tal como una insulina regular o un análogo de insulina de acción rápida (por ejemplo, aspart, lispro o glulisina u otro análogo de insulina), pueden usarse en métodos y usos para tratar la diabetes. Por ejemplo, en el presente documento se describen métodos para tratar la diabetes mediante la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones estables proporcionadas en el presente documento. La diabetes que se va a tratar incluye diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 o diabetes gestacional. También se describen en el presente documento métodos para controlar los niveles de glucosa en sangre en un sujeto mediante la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición estable proporcionada en el presente documento que contiene una insulina de acción rápida. En la práctica de los métodos del presente documento, las composiciones estables se administran por vía subcutánea o intraperitoneal, por ejemplo, mediante una jeringuilla o bolígrafo de insulina o mediante infusión subcutánea continua. En la práctica de los métodos del presente documento, las composiciones pueden administrarse antes de una comida como terapia de insulina prandial. En los métodos, las composiciones estables pueden administrarse usando un método de administración para lograr la infusión de insulina subcutánea continua, tal como mediante una bomba de insulina o un sistema de bucle cerrado. En algunos casos, los métodos incluyen administrar otro fármaco contra la diabetes, que se selecciona de entre, pero sin limitación, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, tiazolidindionas, inhibidores de alfa-glucosidasa, análogos peptídicos, incluyendo análogos del péptido similar a glucagón (GLP) y análogos del péptido inhibidor gástrico (GIP) e inhibidores de DPP-4.

Descripción detallada

A. Definiciones

B. FORMULACIONES DE ENZIMA DEGRADANTE DE HIALURONANO Y GENERACIÓN DE COFORMULACIONES DE INSULINA

1. Formulaciones de enzima degradante de hialuronano
2. Formulaciones de insulina de acción rápida
3. Coformulaciones de enzima degradante de hialuronano e insulina

a. Requisitos de estabilidad opuestos

- i. Conservantes
- ii. NaCl y pH

b. Coformulación compatible

C. ENZIMAS DEGRADANTES DE HIALURONANO

- 5
- 1. Hialuronidasas**
- 10
- a. Hialuronidasas PH20 de tipo mamífero
 - b. Hialuronidasas bacterianas
 - c. Hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos
- 2. Enzimas degradantes de hialuronano truncadas u otras formas solubles**
- 15
- a. PH20 humana truncada en C-terminal
 - b. rHuPH20
- 3. Glucosilación de enzimas degradantes de hialuronano**
- 4. Modificaciones de enzimas degradantes de hialuronano para mejorar sus propiedades farmacocinéticas**
- 20

D. FORMULACIONES DE ENZIMA DEGRADANTE DE HIALURONANO ESTABLES

- 25
- 1. Enzima degradante de hialuronano
 - 2. Cation divalente
 - 3. pH y tampón
 - 4. Tensioactivo
 - 5. Agente antioxidante
 - 6. Modificador de la tonicidad
 - 7. Otros agentes o excipientes
 - 8. Formulaciones de enzima degradante de hialuronano estables ejemplares
- 30

E. POLIPÉPTIDOS DE INSULINA

Insulinas de acción rápida

- 35
- a. Insulina regular
 - b. Análogos de acción rápida (también denominados insulinas de acción rápida)
- 40
- i. Insulina Lispro
 - ii. Insulina Aspart
 - iii. Insulina Glulisina

F. COFORMULACIONES ESTABLES DE INSULINA Y ENZIMA DEGRADANTE DE HIALURONANO

- 45
- 1. Componentes de coformulaciones estables**
- 50
- a. Insulina de acción rápida
 - b. Enzima degradante de hialuronano
 - c. Conservante
 - d. NaCl
 - e. pH
 - f. Tampón
 - g. Lys-Lys
 - h. Excipientes o estabilizantes adicionales ejemplares
- 55
- i. Tensioactivos
 - ii. Modificador de la tonicidad
 - iii. Glicerina
 - iv. Antioxidantes
 - v. Cinc
 - vi. Estabilizador de aminoácidos
 - vii. Inhibidor de hialuronidasa
 - viii. Compuesto nicotínico
 - ix. Otros excipientes o agentes
- 60
- 2. Coformulaciones estables ejemplares**
- 65

- a. Coformulaciones de inyección multidosis (MDI) ejemplares
- b. Coformulaciones de infusión de insulina subcutánea continua (CSII) ejemplares
- c. Coformulaciones de Lys-Lys ejemplares

5 **G. DOSIFICACIÓN Y ADMINISTRACIÓN**

Modo de administración

- a. Jeringuillas
- b. Bolígrafo de insulina
- 10 c. Bombas de insulina y otros dispositivos de administración de insulina
- d. Sistemas de bomba de infusión continua

- i. Sistemas de bucle abierto
- 15 ii. Sistemas de bucle cerrado

H. MÉTODOS PARA PRODUCIR ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN UNA INSULINA O UNA ENZIMA DEGRADANTE DE HIALURONANO Y POLIPÉPTIDOS DE LOS MISMOS

- 20 1. Vectores y células
- 2. Restos enlazadores
- 3. Expresión

- a. Células procariotas
- 25 b. Células de levadura
- c. Células de insecto
- d. Células de mamífero
- e. Plantas

- 30 4. Técnicas de purificación

I. MÉTODOS PARA EVALUAR LA ESTABILIDAD Y LA ACTIVIDAD

- 35 1. Insulina
- 2. Enzimas degradantes de hialuronano

J. USOS TERAPÉUTICOS

- 40 1. Diabetes mellitus

- a. Diabetes de tipo 1
- b. Diabetes de tipo 2
- c. Diabetes gestacional

- 45 2. Terapia de insulina para pacientes críticos

K. TERAPIAS DE COMBINACIÓN

L. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN Y KITS

M. EJEMPLOS

50 **A. DEFINICIONES**

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido de manera común por un experto en la materia a la que pertenece la invención. En caso de que haya una diversidad de definiciones para los términos en el presente documento, prevalecerán aquellas en esta sección. En los casos donde se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección similar, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y que la información concreta en internet puede aparecer y desaparecer, pero se conoce información equivalente y puede accederse a ella fácilmente, tal como efectuando una búsqueda en internet y/o en bases de datos adecuadas. La referencia a las mismas evidencia la disponibilidad y diseminación pública de dicha información.

60 Tal como se usa en el presente documento, "insulina" se refiere a una hormona, precursor o un análogo sintético o recombinante que actúa para aumentar la captación y almacenamiento de glucosa y/o reducir la producción de glucosa endógena. Una insulina humana ejemplar se traduce como un polipéptido precursor de 110 aminoácidos, preproinsulina (SEQ ID NO: 101), que contiene un péptido de señal de 24 aminoácidos que dirige la proteína al retículo endoplasmático (ER) en donde se escinde la secuencia de señal, dando como resultado proinsulina (SEQ ID NO: 102). La proinsulina se procesa adicionalmente para liberar el péptido C-terminal o de cadena conectora de 31

aminoácidos (correspondiente a los restos de aminoácido 57 a 87 del polipéptido de preproinsulina expuesto en la SEQ ID NO: 101, y a los restos de aminoácidos 33 a 63 del polipéptido de proinsulina expuesto en la SEQ ID NO: 102). La insulina resultante contiene una cadena A de 21 aminoácidos (correspondiente a los restos de aminoácidos 90 a 110 del polipéptido de preproinsulina expuesto en la SEQ ID NO: 101, y a los restos de aminoácidos 66 a 86 del polipéptido de proinsulina expuesto en la SEQ ID NO: 102) y una cadena B de 30 aminoácidos (correspondiente a los restos de aminoácidos 25 a 54 del polipéptido de preproinsulina expuesto en la SEQ ID NO: 101, y a los restos de aminoácidos 1 a 30 del polipéptido de proinsulina expuesto en la SEQ ID NO: 102) que se reticular mediante enlaces disulfuro. Una insulina humana reticulada de manera adecuada contiene tres puentes disulfuro: uno entre la posición 7 de la cadena A y la posición 7 de la cadena B, un segundo entre la posición 20 de la cadena A y la posición 19 de la cadena B, y un tercero entre las posiciones 6 y 11 de la cadena A. La referencia a la insulina incluye polipéptidos de preproinsulina, proinsulina e insulina en formas monocatenarias o bicatenarias, formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme, y otras variantes, tales como análogos de insulina, incluyendo polipéptidos que tienen al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 101 o la forma madura del mismo. Los análogos de insulina ejemplares incluyen aquellos expuestos en las SEQ ID NO: 147-149, 152, y aquellos que contienen una cadena A expuesta en las SEQ ID NO: 150, 156, 158, 160, 162 y 164 y/o una cadena B expuesta en las SEQ ID NO: 151, 153-155, 157, 159, 161, 163 y 165.

Los polipéptidos de insulina ejemplares son aquellos de origen mamífero, incluyendo humano. Las secuencias de aminoácidos ejemplares de insulina de origen humano se exponen en las SEQ ID NO: 101-104. Los análogos de insulina ejemplares incluyen aquellos expuestos en las SEQ ID NO: 147-149, 152, y aquellos que contienen una cadena A expuesta en las SEQ ID NO: 150, 156, 158, 160, 162 y 164 y/o una cadena B expuesta en las SEQ ID NO: 151, 153-155, 157, 159, 161, 163 y 165. Los polipéptidos de insulina incluyen también cualquiera de origen no humano, incluyendo, pero sin limitación, cualquiera de los polipéptidos de insulina precursores expuestos en las SEQ ID NO: 105-146. La referencia a una insulina incluye insulinas monoméricas y multiméricas, incluyendo insulinas hexaméricas, así como insulinas humanizadas.

Tal como se usa en el presente documento, "insulina de acción rápida" se refiere a cualquier insulina o composición de insulina de acción rápida para administración aguda a un sujeto diabético en respuesta a una afección hiperglucémica real, percibida, o anticipada en el sujeto que surge en el momento de, o en aproximadamente cuatro horas después de la administración de la insulina de acción rápida (tal como una afección hiperglucémica prandial que sea el resultado o se anticipe que sea el resultado del consumo de una comida), mediante el cual la insulina de acción rápida es capaz de prevenir, controlar o mejorar la afección hiperglucémica aguda. Típicamente, una insulina de acción rápida es una insulina que muestra picos de niveles de insulina tras o aproximadamente no más de cuatro horas después de la administración subcutánea a un sujeto. Las insulinas de acción rápida incluyen insulinas recombinantes e insulinas aisladas (también citadas como insulinas "regulares") tales como la insulina comercializada como Humulin® R, insulinas porcinas e insulinas bovinas, así como análogos de insulina de acción rápida (también denominados análogos de insulina de acción rápida en el presente documento) diseñadas para ser de acción rápida por obra de cambios de aminoácidos. Las preparaciones de insulina regulares ejemplares incluyen, pero sin limitación, insulinas regulares humanas, tales como aquellas comercializadas con los nombres comerciales Humulin® R, Novolin® R y Velosulin®, Insulina Humana, USP e Inyección de Insulina Humana, USP, así como formulaciones ácidas de insulina, tales como, por ejemplo, Insulina Toronto, Insulina Old, e insulina Clear, e insulinas de cerdo regulares, tales como Iletin II® (insulina porcina). Las insulinas regulares tienen típicamente un comienzo de la acción de entre 30 minutos hasta una hora, y un pico de nivel de insulina de 2-5 horas después de la administración.

Tal como se usa en el presente documento, los análogos de insulina de acción rápida (también denominados análogos de insulina de rápida acción) son insulinas que tienen un inicio rápido de la acción. Las insulinas rápidas típicamente son análogos de insulina que se han modificado por ingeniería genética, tal como mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos, para que sean de acción más rápida que las insulinas regulares. Los análogos de insulina de acción rápida tienen típicamente un comienzo de la acción de 10-30 minutos después de la inyección, observándose picos de niveles de insulina a los 30-90 minutos después de la inyección. Los análogos de insulina de acción rápida ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, insulina lispro (por ejemplo, insulina Humalog®), insulina aspart (por ejemplo, insulina NovoLog®), e insulina glulisina (por ejemplo, insulina Apidra®) la composición de insulina de acción rápida comercializada como VIAject® y VIAtab® (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 7.279.457). También se incluyen otras insulinas que tienen una aparición de la acción de 30 minutos o menos y un nivel máximo antes de 90 minutos, típicamente 30-90 minutos, después de la inyección.

Tal como se usa en el presente documento, una insulina humana se refiere a una insulina que es sintética o se produce recombinantemente basándose en el polipéptido humano, incluyendo variantes alélicas y análogos de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, las insulinas humanas de acción rápida o las composiciones de insulina humana de acción rápida incluyen cualquier insulina o composición de una insulina humana que es de acción rápida, pero excluye a las insulinas no humanas, tales como a la insulina regular de cerdo.

5 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "insulinas de acción basal" o "insulinas basales" se refieren a insulinas administradas para mantener un nivel de insulina basal como parte de un régimen de tratamiento general para tratar una afección crónica, tal como la diabetes. Típicamente, se formula una insulina de acción basal para mantener un nivel de insulina aproximadamente de estado estacionario mediante la liberación controlada de insulina cuando se administra de manera periódica (por ejemplo, una o dos veces al día). Las insulinas de acción
10 basal incluyen insulinas cristalinas (por ejemplo, NPH y Lente®, insulina protamina, insulina sulfen), análogos de insulina basal (insulina glargina, HOE 901, NovoSol Basal) y otras formulaciones químicas de insulina (por ejemplo, suspensiones de goma arábiga, lecitina o aceite) que retrasan la velocidad de absorción de la insulina regular. Tal como se usa en el presente documento, las insulinas de acción basal pueden incluir insulinas que se entienden típicamente como de larga acción (típicamente alcanzando un pico de concentración relativamente bajo, a la vez que
15 tiene una duración máxima de la acción de más de aproximadamente 20-30 horas) o de acción inmediata (provocando típicamente picos de concentraciones de insulina aproximadamente a las 4-12 horas después de la administración).

20 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "afección hiperglucémica" o "hiperglucemia" se refieren a una elevación no deseada de la glucosa en sangre.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "afección hipoglucémica" o "hipoglucemia" se refiere a un descenso no deseado de la glucosa en sangre.

25 Tal como se usa en el presente documento, el control glucémico o "control de los niveles de glucosa en sangre" se refiere al mantenimiento de las concentraciones de glucosa en sangre a un nivel deseado, típicamente entre 70-130 mg/dl o 90-110 mg/dl.

30 Tal como se usa en el presente documento, un sistema de bucle cerrado es un sistema integrado para proporcionar control glucémico continuo. Los sistemas de bucle cerrado contienen un mecanismo para medir la glucosa en sangre, un mecanismo para administrar una o más composiciones, incluyendo una composición de insulina, y un mecanismo para determinar la cantidad necesaria de insulina a administrar para lograr el control glucémico. Típicamente, por lo tanto, los sistemas de bucle cerrado contienen un sensor de glucosa, un dispositivo de administración de insulina, tal como una bomba de insulina, y un controlador que recibe información del sensor de glucosa y proporciona órdenes al dispositivo de administración de insulina. Las órdenes pueden generarse mediante
35 un programa informático en el controlador. El programa informático incluye un algoritmo para determinar la cantidad de insulina que hay que administrar para lograr el control glucémico, basándose en los niveles de glucosa en sangre detectados por el sensor de glucosa o anticipados por el usuario. Un sistema de bucle abierto se refiere a dispositivos similares, excepto en que los dispositivos no miden y responden de manera automática a los niveles de glucosa.
40

Tal como se usa en el presente documento, la pauta de dosificación se refiere a la cantidad de insulina administrada y a la frecuencia de administración. La pauta de dosificación es una función de la enfermedad o afección que se va a tratar, y por lo tanto puede variar.

45 Tal como se usa en el presente documento, una enzima degradante de hialuronano se refiere a una enzima que cataliza la escisión de un polímero de hialuronano (también citado como ácido hialurónico o HA) en fragmentos de menor peso molecular. Los ejemplos de enzimas degradantes de hialuronano ejemplares son hialuronidasas, y condroitinasas y liasas particulares que tienen la capacidad de despolimerizar el hialuronano. Las condroitinasas
50 ejemplares que son enzimas degradantes de hialuronano incluyen, pero sin limitación, condroitin ABC liasa (también conocida como condroitinasa ABC), condroitin AC liasa (también conocida como condroitin AC liasa (también conocida como sulfato liasa o condroitin sulfato eliminasa) y condroitina C liasa. La condroitin ABC liasa contiene dos enzimas, condroitin-sulfato-ABC endoliasa (EC 4.2.2.20) y condroitin-sulfato-ABC exoliasa (EC 4.2.2.21). Las condroitin-sulfato-ABC endoliasas y condroitin-sulfato-ABC exoliasas incluyen, pero sin limitación, aquellas de
55 *Proteus vulgaris* y *Flavobacterium heparinum* (la condroitin-sulfato-ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se expone en la SEQ ID NO: 98; Sato et al. (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1):39-46). Las enzimas condroitinasa AC ejemplares de bacterias incluyen, pero sin limitación, aquellas de *Flavobacterium heparinum*, expuestas en las SEQ ID NO: 99, *Victivallis vadensis*, expuestas en las SEQ ID NO: 100 y *Arthrobacter aureescens* (Tkalec et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1):29-35; Ernst et al. (1995) Critical Reviews in Biochemistry and
60 Molecular Biology 30(5):387-444). Las enzimas condroitinasa C ejemplares de bacterias incluyen, pero sin limitación, aquellas 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).

65 Tal como se usa en el presente documento, la hialuronidasa se refiere a una clase de enzimas degradantes 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 humano (EC 3.2.1.35). Las

hialuronidasas incluyen también cualquiera de origen no humano, incluyendo, pero sin limitación, murino, caninas, felinas, leporinas, aviares, bovino, ovino, porcinas, equinas, de peces, de ranas, bacterianas, y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas no humanas ejemplares incluyen, hialuronidasas de vaca (SEQ ID NO: 10, 11, 64 y BH55 (Patentes de Estados Unidos n.º 5.747.027 y 5.827.721), avispa de chaqueta amarilla (SEQ ID NO: 12 y 13), abeja melífera (SEQ ID NO: 14), avispa de cabeza blanca (SEQ ID NO: 15), avispa papelera (SEQ ID NO: 16), ratón (SEQ ID NO: 17-19, 32), cerdo (SEQ ID NO: 20-21), rata (SEQ ID NO: 22-24, 31), de conejo (SEQ ID NO: 25), oveja (SEQ ID NO: 26, 27, 63 y 65), orangután (SEQ ID NO: 28), mono cinomolgo (SEQ ID NO: 29), cobaya (SEQ ID NO: 30), de chimpancé (SEQ ID NO: 185), mono rhesus (SEQ ID NO: 186), *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); 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); cepa USA300 (SEQ ID NO: 81), *Streptococcus pneumoniae* (SEQ ID NO: 82); cepa ATCC BAA-255 / R6 (SEQ ID NO: 83); 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); 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 a la condroitina o el sulfato de condroitina (Ohya, T. y Kaneko, Y. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 198:607). Las hialuronidasas también incluyen aquellas de origen humano. Las hialuronidasas humanas ejemplares 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). Entre las hialuronidasas también se incluyen hialuronidasas solubles, incluyendo, PH20 ovina o bovina, PH20 humana soluble y rHuPH20 soluble. Los ejemplos de hialuronidasas bovinas u ovinas solubles comercialmente disponible incluyen Vitrase® (hialuronidasa ovina) y Amphadase® (hialuronidasa bovina).

La referencia a la enzima degradante de hialuronano, hialuronidasa o PH20 incluye polipéptidos precursores de enzima degradante de hialuronano y polipéptidos maduros de enzima degradante de hialuronano (tales como aquellos en los que se ha eliminado la secuencia de señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad (por ejemplo, formas truncadas en C-terminal), e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los polipéptidos precursores expuestos en las SEQ ID NO: 1 y 10-48, 63-65, 67-100, o la forma madura de los mismos. Por ejemplo, la referencia a una enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, PH20) incluye la PH20 humana madura expuesta en la SEQ ID NO: y formas truncadas de la misma que tengan actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la referencia a la enzima degradante de hialuronano también incluye variantes del polipéptido precursor de PH20 expuestas en las SEQ ID NO: 50-51. Las enzimas degradantes de hialuronano también incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, pegilación, albuminación, glucosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, PH20 se refiere a un tipo de hialuronidasa que sucede en el esperma y es neutra-activa. PH-20 aparece en la superficie del esperma, y en el acrosoma derivado de lisosomas, donde se une a la membrana acrosómica interna. PH20 incluye aquellas de cualquier origen incluyendo, pero sin limitación, humanos, chimpancé, mono cinomolgo, mono rhesus, murino, bovino, ovino, cobaya, conejo y rata. Las proteínas PH20 ejemplares incluyen, pero sin limitación, PH20 humana (polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 1, polipéptido maduro expuesto en la SEQ ID NO: 2), bovina (SEQ ID NO: 11 y 64), de conejo (SEQ ID NO: 25), ovina (SEQ ID NO: 27, 63 y 65), polipéptidos de PH20 de mono cinomolgo (SEQ ID NO: 29), cobaya (SEQ ID NO: 30), de rata (SEQ ID NO: 31), de ratón (SEQ ID NO: 32), de chimpancé (SEQ ID NO: 185) y de mono rhesus (SEQ ID NO: 186). La referencia a PH20 incluye polipéptidos de PH20 precursores y polipéptidos de PH20 maduros (tales como aquellos en los que se ha eliminado una secuencia de señal), formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especie, variantes codificadas por variantes de corte y empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los polipéptidos precursores expuestos en las SEQ ID NO: 1, 10, 25, 27, 30-31, 63-65, 185-186, o las formas maduras de los mismos. Los polipéptidos de PH20 también incluyen aquellos que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, PEGilación, albuminación, glucosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica. Los ejemplos de hialuronidasas bovinas u ovinas solubles comercialmente disponible incluyen hialuronidasa Vitrase® (hialuronidasa ovina) e hialuronidasa Amphadase® (hialuronidasa bovina).

Tal como se usa en el presente documento, una hialuronidasa soluble se refiere a un polipéptido que se secreta de células y no está anclado o asociado a membrana, y por lo tanto puede caracterizarse por su solubilidad en condiciones fisiológicas. Las hialuronidasas solubles pueden distinguirse, por ejemplo, por su reparto en la fase acuosa de una solución de Triton X-114 calentada a 37 °C (Bordier et al., (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7). Las hialuronidasas ancladas a membrana, tal como ancladas a lípidos, se repartirán en la fase rica en detergente, pero se repartirán en la fase pobre en detergente o acuosa después de tratamiento con fosfolipasa C. Entre las hialuronidasas solubles se incluyen hialuronidasas ancladas a membrana en las que se eliminan o modifican una o más regiones asociadas con el anclaje de la hialuronidasa a la membrana, en donde la forma soluble retiene la actividad de hialuronidasa. De este modo, la hialuronidasa soluble, tales como polipéptidos de PH20 solubles, incluyen formas truncadas de los mismos, por ejemplo, formas truncadas en C-terminal en las que están ausentes uno o más aminoácidos del anclaje de glucosil-fosfatidilinositol (GPI). Las hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas solubles recombinantes y aquellas contenidas en o purificadas a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, extractos de testículo de ovejas o vacas. Los ejemplos de dichas hialuronidasas solubles son PH20 humana soluble. Otras hialuronidasas solubles incluyen PH20 ovinas (SEQ ID NO: 27, 63, 65) y bovinas (SEQ ID NO: 11, 64).

Tal como se usa en el presente documento, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluyen polipéptidos de PH20 maduros que carecen de la totalidad o una parte del sitio de unión de glucosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C-terminal, de tal forma que tras la expresión, los polipéptidos no se asocian con la membrana de una célula hospedadora en la que se producen de tal forma que se secretan y, por lo tanto, son solubles en el medio de cultivo celular. De este modo, PH20 humana soluble incluye polipéptidos de PH20 humana truncados en C-terminal. Los polipéptidos de PH20 solubles o truncados en C-terminal ejemplares incluyen polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9, 47-48, 234-254, y 267-273, o un polipéptido que muestra al menos un 70 %, 75 %; 80 %; 85 %; 86 %; 87 %; 88 %; 89 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o más identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9, 47-48, 234-254, y 267-273. Los polipéptidos de sHuPH20 ejemplares incluyen polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9 y 47-48. Los polipéptidos precursores para dichos polipéptidos de sHuPH20 ejemplares incluyen una secuencia de señal. Los ejemplos de los precursores son aquellos expuestos en las SEQ ID NO: 3 y 40-46, cada uno de los cuales contiene una secuencia de señal de 35 aminoácidos en las posiciones de aminoácido 1-35. Los polipéptidos de HuPH20 solubles también incluyen aquellos que se degradan durante o después de los métodos de producción y purificación descritos en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, una PH20 humana recombinante citada como rHuPH20 se refiere a una forma soluble secretada de PH20 humana que se expresa de manera recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO). rHuPH20 soluble es el producto producido por el ácido nucleico que codifica una secuencia de señal, tal como la secuencia de señal nativa, e incluye ácido nucleico que codifica los aminoácidos 36-482 y para los que una secuencia ejemplar, incluyendo el ácido nucleico que codifica la secuencia de señal nativa se expone en la SEQ ID NO: 49. También se incluyen moléculas de ADN que son variantes alélicas de los mismos y otras variantes solubles. El ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble se expresa en células CHO, que secretan el polipéptido maduro. Ya que se produce en el medio de cultivo, existe heterogeneidad en el extremo C-terminal de tal forma que el producto incluye una mezcla de especies que pueden incluir una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 4-9 en diversas abundancias. Se incluyen también variantes alélicas correspondientes y otras variantes, incluyendo aquellas correspondientes a los polipéptidos precursores de PH20 humano expuestos en las SEQ ID NO: 50-51. Otras variantes pueden tener un 60 %, 70 %; 80 %; 85 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o más identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9 y 47-48 en tanto que retengan actividad de hialuronidasa y sean solubles.

Tal como se usa en el presente documento, "composición de insulina de acción súper rápida" se refiere a una composición de insulina que contiene una insulina de acción rápida, particularmente un análogo de insulina de acción rápida, tal como un análogo de insulina con una insulina de acción más rápida, y una enzima degradante de hialuronano (tal como, pero sin limitación, preparaciones de rHuPH20), de tal forma que la composición de insulina, durante los primeros cuarenta minutos después de la administración parenteral a un sujeto, proporciona una exposición a insulina sistémica acumulativa en el sujeto que es mayor que la exposición a insulina sistémica acumulativa proporcionada al sujeto durante el mismo periodo después de administrar la misma dosificación de insulina de acción rápida, a través de la misma ruta, en ausencia de la enzima degradante de hialuronano. La composición de insulina de acción súper rápida puede incluir opcionalmente una insulina de acción basal.

Tal como se usa en el presente documento, una formulación se refiere a una composición que contiene al menos un agente activo o farmacéutico y uno o más excipientes.

Tal como se usa en el presente documento, una coformulación se refiere a una composición que contiene dos o más agentes activos o farmacéuticos y uno o más excipientes. Por ejemplo, una coformulación de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano contiene una insulina de acción rápida, una enzima degradante de hialuronano, y uno o más excipientes.

Tal como se usa en el presente documento, se dice que una composición es estable en condiciones definidas si los ingredientes activos en la misma retienen al menos un nivel requerido de actividad y/o pureza y/o potencia o recuperación en comparación con la actividad y/o pureza y/o potencia o recuperación iniciales. Para los fines del presente documento, una composición es estable si retiene al menos un 50 % de la actividad de enzima degradante de hialuronano y/o si retiene al menos un 90 % de la potencia o recuperación de la insulina y/o al menos un 90 % de la pureza de la insulina.

Tal como se usa en el presente documento, una coformulación estable, que contiene al menos dos ingredientes activos, es estable si cada ingrediente activo retiene al menos el nivel requerido de actividad y/o pureza y/o potencia o recuperación en comparación con la actividad y/o pureza y/o potencia o recuperación inicial. Para los fines del presente documento, una coformulación es estable si retiene al menos un 50 % de la actividad de enzima degradante de hialuronano y si retiene al menos un 90 % de la potencia o recuperación de la insulina y/o al menos un 90 % de la pureza de la insulina.

Tal como se usa en el presente documento, las condiciones definidas se refieren a condiciones de almacenamiento y/o uso.

Tal como se usa en el presente documento, "almacenamiento" significa que una formulación no se administra inmediatamente a un sujeto una vez preparada, pero se mantiene durante un periodo de tiempo en condiciones particulares (por ejemplo, una temperatura particular, tiempo, en forma líquida o liofilizada) antes de su uso. Por ejemplo, una formulación líquida puede almacenarse durante días, semanas, meses o años, antes de su administración a un sujeto a diversas temperaturas, tales como refrigeradas (0° a 10 °C, tal como de 2 °C a 8 °C), a temperatura ambiente (por ejemplo, una temperatura de hasta 32 °C, tal como de 18 °C a aproximadamente o a 32 °C), o a temperatura elevada (por ejemplo, de 30 °C a 42 °C, tal como de 32 °C a 37 °C o de 35 °C a 37 °C).

Tal como se usa en el presente documento, "uso" en referencia a una condición asociada con la estabilidad se refiere al acto de emplear la formulación para un fin específico. Las aplicaciones particulares pueden influenciar la actividad o las propiedades de una proteína o agente. Por ejemplo, determinadas aplicaciones pueden requerir que la formulación se someta a determinadas temperaturas durante determinados periodos de tiempo, que se someta a fluctuaciones de temperatura y/o se someta a agitación, sacudidas, removido u otro movimiento similar que puede afectar a la estabilidad (por ejemplo, actividad y/o solubilidad) de los agentes activos. Los ejemplos de una condición son métodos de infusión continua, mediante los cuales los agentes activos se infunden de manera continua a un sujeto a partir de una bomba asociada al usuario o infusor durante un periodo de varios días. Dicha condición puede asociarse con agitación y fluctuaciones de temperatura.

Tal como se usa en el presente documento, las condiciones definidas para almacenamiento o uso en las que se mide la estabilidad incluyen condiciones de temperatura, condiciones de tiempo de almacenamiento y/o condiciones de uso. Por ejemplo, las condiciones de temperatura definidas incluyen temperaturas bajas o refrigeradas de 2 °C a 8 °C, temperaturas ambientales de 20 °C a 30 °C o temperaturas elevadas de 32 °C a 40 °C. En otro ejemplo, las condiciones de tiempo definidas se refieren a la duración del almacenamiento a diversas condiciones de temperatura, tal como almacenamiento durante días (al menos 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días), semanas (al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas o al menos cuatro semanas) o meses (al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses o más). En un ejemplo adicional, las condiciones de uso definidas se refieren a condiciones que modifican o alteran a la mezcla de composición, tales como condiciones de agitación.

Tal como se usa en el presente documento, una formulación de una sola dosis se refiere a una formulación o coformulación para administración directa. En general, una formulación de una sola dosis es una formulación que contiene una sola dosis de agente terapéutico para administración directa. Las formulaciones de una sola dosis no contienen generalmente conservantes.

Tal como se usa en el presente documento, una formulación multidosis se refiere a una formulación que contiene múltiples dosis de un agente terapéutico y que puede administrarse directamente para proporcionar varias dosis individuales del agente terapéutico. Las dosis pueden administrarse durante el transcurso de minutos, horas, semanas, días o meses. Las formulaciones multidosis pueden permitir el ajuste de la dosis, el agrupamiento de dosis y/o la separación de dosis. Debido a que las formulaciones multidosis se usan durante tiempo, contienen generalmente uno o más conservantes para prevenir el crecimiento bacteriano. Las formulaciones multidosis pueden formularse para inyección o infusión (por ejemplo, infusión continua).

Tal como se usa en el presente documento, una "coformulación para inyección multidosis estable (MDI)" se refiere a una coformulación estable que es estable durante al menos 6 meses a una temperatura desde o desde aproximadamente 2 °C a 8 °C y/o durante al menos 14 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 20 °C a 30 °C, de tal forma que se mantiene el nivel requerido de actividad y/o de pureza y/o de potencia o recuperación durante el tiempo y temperatura definidos en comparación con la actividad y/o la pureza y/o la potencia o recuperación iniciales. Por ejemplo, una formulación de inyección de múltiples dosis estable retiene al menos un 50 % de la actividad de la enzima degradante de hialuronano y al menos un 90 % de la potencia o recuperación de

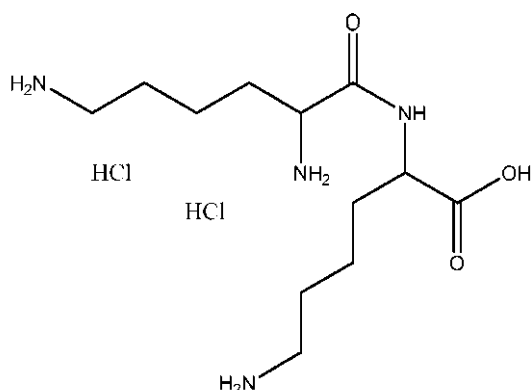
insulina y/o al menos un 90 % de la pureza de insulina durante al menos 6 meses a una temperatura de o de aproximadamente 2 °C a 8 °C y/o durante al menos 14 días a una temperatura de o de aproximadamente 20 °C a 30 °C.

5 Tal como se usa en el presente documento, una "formulación para infusión de insulina continua" se refiere a una coformulación estable que es estable durante al menos 3 días a una temperatura de o de aproximadamente 32 °C a 40 °C, de tal forma que se mantiene el nivel requerido de actividad y/o de pureza y/o de potencia o recuperación durante el tiempo y temperatura definidos en comparación con la actividad y/o la pureza y/o la potencia o recuperación iniciales. Por ejemplo, una formulación para infusión de insulina continua retiene al menos el 50 % de la actividad de la enzima degradante de hialuronano y al menos un 90 % de la potencia o recuperación de insulina
10 y/o al menos un 90 % de la pureza de insulina durante al menos 3 días a una temperatura de o de aproximadamente 32 °C a 40 °C.

15 Tal como se usa en el presente documento, la terapia de infusión de insulina subcutánea continua (CSII) se refiere a una pauta de dosificación de insulina mediante la cual se administra insulina a velocidades programadas durante un trascurso de varios días a partir de un pequeño infusor o bomba por vía subcutánea mediante un conjunto de infusión conectado a la bomba. Típicamente, la terapia de CSII continúa durante 2-4 días antes de que se reemplace el conjunto de infusor y el depósito de la bomba. El tratamiento combina liberación de insulina basal continua (velocidad basal) y dosis de bolo de insulina adicionales antes de las comidas y en respuesta a los valores de glucemia (es decir, bolos correctivos). La terapia de CSII usa generalmente un controlador de la jeringuilla accionado por baterías, una bomba de insulina u otro dispositivo similar para administrar una insulina de acción rápida, en particular un análogo de insulina, de acuerdo con la pauta de dosificación. En general, la pauta de liberación de insulina basal continua se ajusta por un médico para cada paciente. Las dosis de bolo se determinan basándose en las necesidades prandiales y las respuestas glucémicas. De este modo, la terapia de CSII es específica del paciente.
20 Se encuentra dentro de las capacidades del médico experto y del paciente determinar la pauta de dosis de insulina particular para cada paciente dependiendo de las necesidades de los pacientes y otros parámetros específicos del paciente, tales como peso, edad, ejercicio, dieta y síntomas clínicos del paciente.
25

30 Tal como se usa en el presente documento, un agente estabilizante se refiere a un compuesto añadido a la formulación para proteger a la enzima degradante de hialuronano o a la insulina o a ambas frente a la degradación, tal como en condiciones de sal, pH y temperatura a las que se almacenan o usan las coformulaciones del presente documento. Por lo tanto, se incluyen agentes que previenen la degradación de las proteínas por otros componentes en las composiciones. Los ejemplos de dichos agentes son aminoácidos, derivados de aminoácidos, aminas, azúcares, polioles, sales y tampones, tensioactivos, inhibidores o sustratos y otros agentes tal como se describen en el presente documento.
35

40 Tal como se usa en el presente documento, lisil lisina (Lys-Lys o dilisina) se refiere a un dipéptido de Lys-Lys, sal, derivado, análogo o mimético del mismo. Por ejemplo, la referencia a Lys-Lys incluye sales del mismo, tal como la sal de diclorhidrato de Lys-Lys, es decir, diclorhidrato de Lys-Lys (o diclorhidrato de dilisina; H-Lys-Lys-OH HCl). El diclorhidrato de Lys-Lys se representa por la siguiente fórmula:



45 La referencia a Lys-Lys también es a derivados que contienen un grupo protegido, tal como Fmoc-, Noc- o Cbz. Los ejemplos de diclorhidratos de Lys-Lys comercialmente disponibles incluyen, pero sin limitación, aquellos disponibles a través de Sigma Aldrich, RnD Chem., MP Bio, Tetrahedron Scientific Inc., y Crescent Chemical Company. Un diclorhidrato de Lys-Lys comercialmente disponible ejemplar es el diclorhidrato de Lys-Lys disponible a través de Sigma Aldrich (n.º de producto L5502) o de RnD Chem (n.º de producto G-2675).

50 Tal como se usa en el presente documento, una prueba de eficacia antimicrobiana demuestra la eficacia del sistema conservador en un producto. Un producto se inocula con una cantidad controlada de organismos específicos. La prueba entonces compara el nivel de microorganismos encontrado en una muestra de control frente a la muestra de

ensayo durante un periodo de 28 días. Los parámetros para llevar a cabo una prueba de eficacia antimicrobiana son conocidos para un experto en la materia, tal como se describe en el presente documento.

5 Tal como se usa en el presente documento, una cantidad antimicrobiana o antimicrobianamente eficaz de un conservador se refiere a una cantidad del conservante que elimina o inhibe la propagación de organismos microbianos en una muestra que pueden introducirse a causa de su almacenamiento o uso. Por ejemplo, para envases multidosis, una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante inhibe el crecimiento de microorganismos que pueden introducirse mediante la extracción repetida de dosis individuales. La USP y la EP (EPA y EPB) tienen requisitos antimicrobianos que determinan la eficacia del conservante, y que varían respecto de su rigurosidad. Por ejemplo, una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante es una cantidad tal que tiene lugar una reducción de al menos 1,0 log₁₀ unidades en organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación en una prueba de eficacia del conservante antimicrobiano (APET). En un ejemplo particular, una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante es una cantidad tal que tiene lugar una reducción de al menos 1,0 log₁₀ unidades en organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación, tiene lugar una reducción de al menos 3,0 log₁₀ unidades en organismos bacterianos a los 14 días después de la inoculación, o al menos no tiene lugar un aumento adicional de organismos bacterianos tras 28 días después de la inoculación; y al menos no tiene lugar un aumento en los organismos fúngicos tras 7 días después de la inoculación. En un ejemplo adicional, una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante es una cantidad tal que tiene lugar una reducción de al menos 1,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a las 24 horas después de la inoculación, o tiene lugar una reducción de al menos 3,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación, no se produce un aumento en los organismos bacterianos tras 28 días después de la inoculación, o tiene lugar una reducción de al menos 1,0 log₁₀ unidades de organismos fúngicos a los 14 días después de la inoculación, y al menos no tiene lugar un aumento adicional en los organismos fúngicos tras 28 días después de la inoculación. En un ejemplo adicional, una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante es una cantidad tal que tiene lugar una reducción de al menos 2,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a las 6 horas después de la inoculación, o tiene lugar una reducción de al menos 3,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a las 24 horas después de la inoculación, no se produce recuperación de organismos bacterianos tras 28 días después de la inoculación de la composición con el inóculo microbiano, o tiene lugar una reducción de al menos 2,0 log₁₀ unidades de organismos fúngicos a los 7 días después de la inoculación, y al menos no tiene lugar un aumento adicional en los organismos fúngicos tras 28 días después de la inoculación.

35 Tal como se usa en el presente documento, el "excipiente" se refiere a un compuesto en una formulación de un agente activo que no proporciona el efecto biológico del agente activo cuando se administra en ausencia del agente activo. Los excipientes ejemplares incluyen, pero sin limitación, sales, tampones, estabilizantes, modificadores de la tonicidad, metales, polímeros, tensioactivos, los conservantes, aminoácidos y azúcares.

40 Tal como se usa en el presente documento, un "tampón" se refiere a una sustancia, generalmente una solución, que puede mantener su pH constante, a pesar de la adición de ácidos fuertes o bases fuertes y la influencia externa de la temperatura, presión, volumen y potencial redox. El tampón previene el cambio en la concentración de otra sustancia bioquímica, por ejemplo, sistemas de donante y aceptor de protones que previenen cambios notables en la concentración de ión hidrógeno (pH). Los valores de pH de todos los tampones son dependientes de la temperatura y de la concentración. La elección del tampón para mantener un valor o intervalo de pH puede determinarse empíricamente por un experto en la materia basándose en la capacidad tamponadora conocida de los tampones conocidos. Los tampones ejemplares incluyen, pero sin limitación, tampón bicarbonato, tampón cacodilato, tampón fosfato o tampón Tris. Por ejemplo, el tampón Tris (trometamina) es un tampón de base amina que tiene un pKa de 8,06 y tiene un intervalo de pH eficaz entre 7,9 y 9,2. Para los tampones Tris, el pH aumenta aproximadamente 0,03 por cada disminución de °C, y se reduce de 0,03 a 0,05 unidades por cada dilución de factor diez.

50 Tal como se usa en el presente documento, la actividad se refiere a una actividad o actividades funcionales de un polipéptido o porción del mismo asociada con una proteína de longitud completa (entera). Las actividades funcionales incluyen, pero sin limitación, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (capacidad para unirse o competir con un polipéptido por la unión a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, capacidad para formar multímeros, y la capacidad para unirse específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

55 Tal como se usa en el presente documento, la actividad de hialuronidasa se refiere a la capacidad para catalizar enzimáticamente la escisión del ácido hialurónico. El ensayo XXII de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) para hialuronidasa determina la actividad de hialuronidasa de manera indirecta midiendo la cantidad de sustrato de ácido hialurónico de mayor peso molecular, o hialuronano, (HA) restante después de que se deje reaccionar la enzima con el HA durante 30 min a 37 °C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Puede usarse una solución de patrón de referencia en un ensayo para determinar la actividad relativa, en unidades, de cualquier hialuronidasa. Los ensayos *in vitro* para determinar la actividad de hialuronidasa de las hialuronidasas, tales como rHuPH20 soluble, se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Los ensayos ejemplares incluyen el ensayo de microturbidez descrito más adelante (véase, por ejemplo, el ejemplo 2) que mide la escisión de ácido hialurónico por hialuronidasa indirectamente mediante la detección del precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico se une con albúmina de suero. Pueden usarse patrones de

referencia, por ejemplo, para generar una curva patrón para determinar la actividad en unidades de la hialuronidasa que se está ensayando.

5 Tal como se usa en el presente documento, "cantidad funcionalmente equivalente" o las variaciones gramaticales del mismo, con referencia a una enzima degradante de hialuronano, se refiere a la cantidad de enzima degradante de hialuronano que logra el mismo efecto que una cantidad (tal como un número de unidades conocido de actividad de hialuronidasa) de una enzima de referencia, tal como una hialuronidasa. Por ejemplo, la actividad de cualquier enzima degradante de hialuronano puede compararse con la actividad de rHuPH20 para determinar la cantidad funcionalmente equivalente de una enzima degradante de hialuronano que podría lograr el mismo efecto que una cantidad conocida de rHuPH20. Por ejemplo, la capacidad de una enzima degradante de hialuronano para actuar como un agente difusor o de diseminación puede evaluarse inyectándolo en la piel del lateral de ratones con azul trypan (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20050260186), y puede determinarse la cantidad de enzima degradante de hialuronano necesaria para lograr la misma cantidad de difusión que, por ejemplo, 100 unidades de un patrón de referencia de hialuronidasa. La cantidad de enzima degradante de hialuronano necesaria es, por lo tanto, funcionalmente equivalente a 100 unidades. En otro ejemplo, puede evaluarse la capacidad de una enzima degradante de hialuronano para aumentar el nivel y la velocidad de absorción de una insulina coadministrada en sujetos humanos, tal como se describe más adelante en el ejemplo 1, y la cantidad de enzima degradante de hialuronano requerida para lograr el mismo aumento en el nivel y velocidad de absorción de insulina que, por ejemplo, la cantidad administrada de rHuPH20, puede determinarse (tal como evaluando la concentración máxima de insulina en la sangre (C_{max}), el tiempo necesario para lograr la concentración máxima de insulina en la sangre (t_{max}) y la exposición a insulina sistémica acumulativa durante un periodo de tiempo dado (ABC).

25 Tal como se usa en el presente documento, los restos de los α -aminoácidos de origen natural son los restos de aquellos 20 α -aminoácidos encontrados en la naturaleza que se incorporan en las proteínas mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm afin en seres humanos.

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

Tal como se usa en el presente documento, un péptido se refiere a un polipéptido que es mayor o igual a dos aminoácidos de longitud, y menor de o igual a 40 aminoácidos de longitud.

40 Tal como se usa en el presente documento, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento se identifican de acuerdo con sus abreviaturas de tres letras o una letra conocidas (tabla 1). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se identifican con las denominaciones de una letra convencionales usadas rutinariamente en la técnica.

45 Tal como se usa en el presente documento, 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 del presente documento, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en donde el carbono α tiene una cadena lateral).

50 Tal como se usa en el presente documento, "resto de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus engarces peptídicos. Los restos de aminoácidos descritos en el presente documento se suponen en la forma isomérica "L". Los restos en la forma isomérica "D", que se denominan de ese modo, pueden sustituirse por cualquier resto de L-aminoácido en tanto que se retenga la propiedad funcional deseada por el polipéptido. NH_2 se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido. $COOH$ se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo carboxilo terminal de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura de péptidos convencional descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y adoptada en la 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, las abreviaturas para restos de aminoácidos se muestran en la tabla 1:

Tabla 1 - Tabla de correspondencia

SÍMBOLO		
1 letra	3 letras	AMINOÁCIDO
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina

SÍMBOLO		
1 letra	3 letras	AMINOÁCIDO
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

- Todas las secuencias de restos de aminoácidos representadas en el presente documento por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de extremo amino terminal a extremo carboxilo terminal. Además, la expresión "resto de aminoácido" se define ampliamente para incluir los aminoácidos listados en la tabla de correspondencia (tabla 1) y aminoácidos modificados e infrecuentes, tales como aquellos citados en la 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, e incorporados al presente documento por referencia. Además, un guion al comienzo o final de una secuencia de resto de aminoácido indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más restos de aminoácidos, a un grupo amino-terminal, tal como NH₂ o a un grupo carboxilo terminal, tal como COOH.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, los "aminoácidos de origen natural" se refieren a los 20 L-aminoácidos que aparecen en los polipéptidos.
- Tal como se usa en el presente documento, un "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura similar a un aminoácido natural pero que se ha modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Los aminoácidos de origen no natural por lo tanto incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural e incluyen, pero sin limitación, los D-isoestereoisómeros de aminoácidos. Los aminoácidos no naturales ejemplares se describen en el presente documento y son conocidos para los expertos en la materia.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, una construcción de ADN es una molécula de ADN mono o bicatenaria, lineal o circular que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos en de un modo no hallado en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como resultado de la manipulación por el ser humano, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN mayor que tiene atributos específicos. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido específico es una porción de una molécula de ADN mayor, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee en dirección de 5' a 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término polinucleótido significa un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleótido o ribonucleótido leídos desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro*, o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se proporciona en el presente documento en términos de nucleótidos (abreviado como "nt") o pares de bases (abreviado como "pb"). El término nucleótidos se usa para moléculas mono y bicatenarias en los casos donde el contexto lo permita. Cuando se aplica
- 35

el término a moléculas bicatenarias, se usa para indicar la longitud general y se entenderá que sea equivalente a la expresión pares de bases. Los expertos en la materia reconocerán que las dos hebras de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos de las mismas pueden estar escalonados; por lo tanto, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido bicatenaria pueden no estar emparejados. Dichos extremos no emparejados, por lo general, no excederán los 20 nucleótidos de longitud.

Tal como se usa en el presente documento, la "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de la proteína o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede basarse en el grado de identidad y/o homología de secuencias de restos y los restos contenidos en las mismas. Los expertos en la materia conocen métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencia, se alinean dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos de un modo que produce un nivel máximo de identidad entre las secuencias.

Tal como se usa en el presente documento, "identidad" se refiere al alcance hasta el que las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos son invariantes. El alineamiento de secuencias de aminoácidos, y hasta cierto punto de secuencias de nucleótidos, también puede tener en cuenta diferencias conservativas y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son aquellas que conservan las propiedades fisicoquímicas de los restos implicados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas a lo largo de la longitud completa de las secuencias e incluyendo todos los restos) o locales (el alineamiento de una porción de las secuencias que incluye solo la región o las regiones más similares). La "identidad" en sí misma tiene un significado reconocido en la técnica y puede calcularse usando técnicas publicadas. (Véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Aunque existen una serie de métodos para medir la identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" se conoce bien para los expertos en la materia (Carrillo, H. y Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

Tal como se usa en el presente documento, homólogo (con respecto a secuencias de ácido nucleico y/o de aminoácidos) significa aproximadamente mayor que o igual a un 25 % de homología de secuencia, típicamente mayor que o igual al 25 %, 40 %; 50 %; 60 %; 70 %; 80 %; 85 %; 90 % o 95 % de homología de secuencia; el porcentaje preciso puede especificarse en caso necesario. Para los fines del presente documento, los términos "homología" e "identidad" se usan a menudo de manera intercambiable, a menos que se indique lo contrario. En general, para la determinación del porcentaje de homología o identidad, las secuencias se alinean de tal modo que se obtiene la coincidencia de mayor orden (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Mediante homología de secuencia, se determina el número de aminoácidos conservados mediante programas de algoritmos de alineamiento convencionales, y pueden usarse con penalizaciones por hueco por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas hibridarían típicamente a rigurosidad moderada o a rigurosidad elevada a lo largo de toda la longitud del ácido nucleico de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico hibridante.

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

penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización para los huecos terminales.

5 Por lo tanto, tal como se usan en el presente documento, los términos "identidad" u "homología" representan una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y uno de referencia. Tal como se usa en el presente documento, la expresión al menos "un 90 % idéntica a" se refiere a porcentajes de identidad del 90 al 100 % en relación a la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de referencia del polipéptido. La identidad a un nivel del 90 % o más es indicativa del hecho de que, asumiendo con fines ilustrativos que se compare una longitud del polipéptido de ensayo y de referencia de 100 aminoácidos, no más del 10 % (es decir, 10 de los 100) de los aminoácidos en el polipéptido de ensayo difiere de los del polipéptido de referencia. Pueden efectuarse comparaciones similares entre polinucleótidos de ensayo y de referencia. Dichas diferencias pueden representarse como mutaciones puntuales distribuidas al azar a lo largo de la longitud completa de un polipéptido o pueden agruparse en una o más localizaciones de longitud variante hasta el máximo permisible, por ejemplo, 10/100 diferencias de aminoácidos (identidad de aproximadamente el 90 %). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o eliminaciones de ácido nucleicos o aminoácidos. Al nivel de homología o identidades por encima de aproximadamente el 85-90 %, el resultado debería ser independiente de los parámetros del programa y de huecos configurados; dichos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, a menudo mediante alineamiento manual sin basarse en programas informáticos.

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

30 Tal como se usa en el presente documento, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar de tal forma que la propiedad de interés queda sustancialmente sin cambios de tal forma que el producto sustancialmente idéntico puede usarse en lugar del producto.

Tal como se usa en el presente documento, también se entiende que las expresiones "sustancialmente idéntico" o "similar" varía dependiendo del contexto, como tenderán los expertos en la materia relevante.

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

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

60 Tal como se usa en el presente documento, las variantes de especie se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamífero, tales como ratones y seres humanos.

65 Tal como se usa en el presente documento, la modificación es en referencia a una modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye eliminaciones, inserciones, y reemplazos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Los métodos para modificar un polipéptido son rutinarios para los expertos en la materia, tal como mediante el uso de metodologías de ADN recombinante.

Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido o proteína o una porción biológicamente activa del mismo aislado o purificado está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido del que se deriva la proteína, o está sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. Puede determinarse que las preparaciones están sustancialmente libres si parecen libres de impurezas fácilmente detectables según se determina mediante métodos de análisis estándar, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), usados por los expertos en la materia para evaluar dicha pureza, o están lo suficientemente puros como para que una purificación adicional no altere de manera detectable las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente puros químicamente se conocen por los expertos en la materia. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En dichos casos, la purificación adicional puede aumentar la actividad específica del compuesto.

La expresión sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las que se separa la proteína de componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o produce de manera recombinante. En una realización, la expresión sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente el 30 % (en peso seco) de proteínas no enzimáticas (también citadas en el presente documento como proteínas contaminantes), generalmente menos de aproximadamente un 20 % de proteínas no enzimáticas o un 10 % de proteínas no enzimáticas o menos de aproximadamente un 5 % de proteínas no enzimáticas. Cuando la proteína enzimática se produce recombinantemente, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de proteína enzimática.

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

Tal como se usa en el presente documento, sintética, en 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 una molécula de péptido que se produce mediante métodos recombinantes y/o mediante métodos de síntesis química.

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

Tal como se usa en el presente documento, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir un ácido nucleico heterólogo en células bien para la expresión o para la replicación de los mismos. Los vectores permanecen típicamente episómicos, pero pueden diseñarse para efectuar la integración de un gen o porción del mismo en n cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamífero. La selección y el uso de dichos vehículos se conoce bien por los expertos en la materia.

Tal como se usa en el presente documento, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que está unido operativamente con secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de dichos fragmentos de ADN. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y pueden incluir opcionalmente uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores de selección, un potenciador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión se derivan genéticamente de ADN de plásmido o vírico, 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 vector de fago, virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula hospedadora adecuada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión adecuados se conocen bien por los expertos en la materia 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 hospedadora.

Tal como se usa en el presente documento, un vector también incluye "vectores de virus" o "vectores víricos". Los vectores víricos son virus modificados por ingeniería genética unidos a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos en las células.

Tal como se usa en el presente documento, unido operablemente o de manera operativa cuando se hace referencia a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de tal forma que funcionan en concierto para sus fines previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia cadena abajo del promotor y cadena arriba de cualquier secuencia traducida. El promotor es normalmente el dominio al que normalmente se une la maquinaria transcripcional para iniciar la transcripción y sigue a lo largo del segmento codificante hasta el terminador.

65

5 Tal como se usa en el presente documento, el término evaluar pretende incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteasa, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también para obtener un índice, relación, porcentaje, valor visual u otro indicativo del nivel de actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y las especies químicas expresadas realmente no tienen, por supuesto, que ser el producto de la proteólisis en sí, pero puede ser, por ejemplo, un derivado del mismo o alguna sustancia adicional. Por ejemplo, la detección de un producto de escisión de una proteína de complemento, tal como mediante SDS-PAGE y tinción de proteína con azul de Coomassie.

10 Tal como se usa en el presente documento, la actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o respuestas fisiológicas que son el resultado 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 dichos compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden observarse en sistemas *in vitro* diseñados para ensayar o usar dichas actividades. Por lo tanto, para los fines del presente documento una actividad biológica de una proteasa es su actividad catalítica en la que se hidroliza un polipéptido.

15 Tal como se usa en el presente documento, equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácido nucleico, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando se usa equivalente en referencia a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos solo con sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando equivalente se refiere a una propiedad, la propiedad no necesita estar presente en la misma medida (por ejemplo, dos péptidos pueden mostrar velocidades distintas del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades normalmente son sustancialmente las mismas.

20 Tal como se usa en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla. Puede ser una solución, suspensión, líquido, polvo, pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de las mismas.

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

30 Tal como se usa en el presente documento, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo que sea el resultado de una causa o afección incluyendo, pero sin limitación, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas, y caracterizados por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés incluyen en el presente documento diabetes mellitus.

35 Tal como se usa en el presente documento, "tratar" a un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto se alivian total o parcialmente, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por lo tanto, tratamiento abarca la profilaxis, la terapia y/o la cura. La profilaxis se refiere a la prevención de una enfermedad potencial y/o una prevención del empeoramiento de los síntomas o de la progresión de una enfermedad. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de una coformulación de insulina y enzima degradante de hialuronano proporcionada en el presente documento.

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

45 Tal como se usa en el presente documento, tratamiento significa cualquier modo mediante el que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación mejoran o de otro modo alteran de manera beneficiosa.

50 Tal como se usa en el presente documento, un efecto terapéutico significa un efecto que sea el resultado del tratamiento a 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.

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

60 Tal como se usa en el presente documento, un paciente se refiere a un sujeto humano que muestra síntomas de una enfermedad o trastorno.

65 Tal como se usa en el presente documento, el alivio de los síntomas de una enfermedad o trastorno concreto mediante un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otro agente terapéutico, se refiere a cualquier alivio, ya sea permanente o temporal, duradero o transitorio, de los síntomas que puede atribuirse a o asociarse con la administración de la composición o el agente terapéutico.

Tal como se usa en el presente documento, la prevención la profilaxis se refiere a métodos en los que se reducen los riesgos de desarrollar una enfermedad o afección.

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

10 Tal como se usa en el presente documento, una dosis de insulina terapéuticamente eficaz es la cantidad de insulina necesaria o suficiente para lograr el control glucémico. Esta cantidad puede determinarse empíricamente, tal como mediante exposición a glucosa o alimentos. Las composiciones proporcionadas en el presente documento contienen una cantidad o concentración terapéuticamente eficaz de insulina de tal forma que se administran dosis terapéuticamente eficaces.

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

20 Tal como se usa en el presente documento, un "artículo de fabricación" es un producto que se fabrica y se vende. Tal como se usa a lo largo de la presente solicitud, el término pretende abarcar una composición de insulina de acción rápida y una composición de enzima degradante de hialuronano contenida en los mismos artículos de envasado o por separado.

25 Tal como se usa en el presente documento, fluido se refiere a cualquier composición que pueda fluir. Los fluidos, por lo tanto, abarcan composiciones que se encuentran en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones similares.

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

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

40 Tal como se usa en el presente documento, un control se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de ensayo, excepto en que no se trata con un parámetro de ensayo, o, si es 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.

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

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

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

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

60 **B. FORMULACIONES DE ENZIMA DEGRADANTE DE HIALURONANO Y GENERACIÓN DE COFORMULACIONES DE INSULINA**

65 En el presente documento se proporcionan formulaciones estables de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble, por ejemplo, una PH20. En general, las enzimas degradantes de hialuronano requieren una salinidad relativamente elevada para mantener la actividad enzimática (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º US20110066111). Las formulaciones existente también contienen

albúmina de suero humana (HSA) para estabilidad. En el presente documento se ha hallado que Lys-Lys y el cloruro de magnesio ($MgCl_2$) estabilizan a enzimas degradantes de hialuronano (por ejemplo, hialuronidasa soluble, por ejemplo, PH20) más que el NaCl. Además, en presencia de Lys-Lys o $MgCl_2$, no es necesaria ni requerida la HSA. Las formulaciones proporcionadas en el presente documento ofrecen ventajas frente a las formulaciones existentes, incluyendo estabilidad aumentada, en particular a temperaturas mayores y durante tiempos más prolongados. En el presente documento se proporcionan formulaciones estables de una enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, una hialuronidasa soluble, por ejemplo, PH20) que contiene Lys-Lys como estabilizante.

Las coformulaciones de una enzima degradante de hialuronano con otro agente terapéutico también deben mostrar estabilidad en diversas condiciones. Esto puede ser un problema cuando los requisitos de formulación del otro agente terapéutico difieren, y en ocasiones se oponen, a los requisitos de formulación necesarios para una enzima degradante de hialuronano. En el presente documento se observa que ese es el caso para coformulaciones de una enzima degradante de hialuronano e insulina cuando se mezclan. En el presente documento se proporcionan coformulaciones estables de una enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, una hialuronidasa soluble, tal como PH20) y una insulina, por ejemplo, una insulina de acción rápida o un análogo de insulina.

Las formulaciones estables, incluyendo formulaciones comercializadas, de insulinas de acción rápida, contienen típicamente diferentes excipientes y componentes y/o diferentes concentraciones de excipientes y componentes, que son necesarios para la estabilidad, solubilidad y actividad de la insulina, que aquellos encontrados en formulaciones estables de enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas solubles. Estas formulaciones optimizadas de insulinas e hialuronidasas solubles son incompatibles cuando se mezclan en una coformulación, de tal forma que la estabilidad, solubilidad y/o actividad de la insulina y la hialuronidasa soluble coformuladas generalmente se reducen. Dicha incompatibilidad es una barrera importante para desarrollar coformulaciones estables de estos agentes.

1. Formulaciones de enzima degradante de hialuronano

Las formulaciones existentes de una enzima degradante de hialuronano contienen generalmente NaCl, típicamente NaCl de 130 mM a 150 mM. Por ejemplo, Hylenex® recombinante (inyección de hialuronidasa humana) contiene, por ml, 8,5 mg de NaCl (145 mM), 1,4 mg de fosfato de sodio dibásico (9,9 mM), 1,0 mg de albúmina humana, 0,9 mg de edetato disódico (2,4 mM), 0,3 mg de $CaCl_2$ (2,7 mM) y NaOH para ajustar el pH a 7,4. Otras formulaciones de hialuronidasa humana soluble, tales como las formulaciones de rHuPH20 descritas en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º US2011/0053247, incluyen NaCl 130 mM, Hepes 10 mM, pH 7,0; o histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0.

Las formulaciones de enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas, incluyendo una PH20, tal como rHuPH20, contienen componentes diferentes a las formulaciones de insulinas. Por ejemplo, PH20 es más estable a valores de pH bajos entre pH 5,5 a 6,5. Además de un pH menor, las formulaciones de hialuronidasa humana contienen más NaCl que las formulaciones de insulina, ambos de los cuales promueven la estabilidad de la proteína y mantienen la actividad enzimática. Asimismo, las formulaciones de hialuronidasa soluble humana, tales como Hylenex® recombinante (inyección de hialuronidasa humana) han sido hasta ahora formulaciones monodosis. Como tales, no contienen conservantes.

2. Formulaciones de insulina de acción rápida

Las insulinas de acción rápida, que incluyen insulina regular y análogos de insulina de acción rápida, se formulan típicamente para optimizar la solubilidad de la insulina, la estabilidad y la pureza a temperaturas refrigeradas (por ejemplo, 4 °C, tal como para almacenamiento a largo plazo) así como a temperaturas elevadas (por ejemplo, 25 °C y 30 °C). Las formulaciones se preparan para conferir estabilidad a lo largo del tiempo, en particular, para el uso y envasado multidosis. Por ejemplo, las etiquetas para productos de insulina comercializados, incluyendo Humulin®, Humalog®, Novolog® y Apidra®, indican una estabilidad durante al menos 24 meses a una temperatura de almacenamiento de 2-8 °C y de 28 días almacenándolas a 25 °C o 30 °C. Asimismo, se cree que las formulaciones son estables durante al menos 6 días a temperaturas de almacenamiento de o de aproximadamente 37 °C.

Aunque pueden diferir las formulaciones óptimas para cada insulina, típicamente hay algunos aspectos comunes en las formulaciones. Por ejemplo, las formulaciones de insulina contienen un tampón, modificadores de la tonicidad y uno o más conservantes. Muchas insulinas de acción rápida también contienen cinc, mientras que algunas también contienen un estabilizante. Además, las formulaciones se preparan típicamente a un pH neutro alto (por ejemplo, 7,0-7,8). La tabla 2 a continuación expone las formulaciones comercializadas seleccionadas de cuatro insulinas de acción rápida, incluyendo una insulina regular y tres análogos de insulina de acción rápida.

Tabla 2. Formulaciones de insulina de acción rápida seleccionadas										
Insulina	API (U/ml)	PH	Zn	Tampón	Modificador de la tonicidad		Estabilizante	Conservante		
					NaCl	Glicerina		Fenol	m-cresol	
Humulin® insulina recombinante	100 u 500	7,0-7,8	0,017 o 0,085 mg/ml	Fosfato sódico dibásico	-	16 mg/ml (170 mM)	-	-	-	-
Humalog® insulina lispro	100	7,0-7,8	0,0197 mg/ml	1,88 mg/ml (13,2 mM) fosfato sódico dibásico	-	16 mg/ml (170 mM)	-	trazas	3,15 mg/ml (0,315 %)	-
NovoLog® insulina aspart	100	7,2-7,6	0,0196 mg/ml	1,25 mg/ml (7 mM) dihidrato de hidrogenofosfato disódico	0,58 mg/ml (10 mM)	16 mg/ml (170 mM)	-	1,5 mg/ml (0,15 %)	1,72 mg/ml (0,172 %)	-
Apidra® insulina glulisina	100	7,3	-	6 mg/ml (50 mM) Tris	5 mg/ml (85 mM)	-	polisorbato 20 al 0,01 %	-	3,15 mg/ml (0,315 %)	-

Las formulaciones de insulina de acción rápida contienen un conservante, que previene que se introduzca contaminación microbiana en la formulación mediante el acceso repetido, tal como la inserción repetida de una aguja, para múltiples dosificaciones. Aunque actualmente se usan muchos conservantes en productos farmacológicos parenterales aprobados, compuestos fenólicos, tales como fenol, metacresol (m-cresol) y parabenos son los más comúnmente usados en formulaciones de insulina. Estos compuestos fenólicos sirven no solo como agentes antimicrobianos eficaces, pero también pueden unirse a sitios alostéricos en el hexámero de insulina y cambiar la conformación general de la estructura de mayor orden de insulina. Esto estabiliza a los hexámeros inhibiendo la formación de agregados filamentosos (fibrillas), que se forman más fácilmente con monómeros que con hexámeros de insulina (Rahuel-Clermont et al. (1997) *Biochemistry* 36:5837-5845). Aunque estos conservantes pueden actuar como estabilizantes, también pueden reducir la solubilidad de la insulina si está presente a una concentración demasiado elevada. Por lo tanto, la concentración de conservantes en la insulina es crítica para la estabilidad y solubilidad del agente.

Típicamente, se incluyen uno o más modificantes de la tonicidad en las formulaciones de insulina para ajustar la isotonicidad de la preparación. Los modificadores de la tonicidad ejemplares que están a menudo presentes en las formulaciones de insulina incluyen glicerina y/o NaCl. Además de afectar a la isotonicidad, el NaCl afecta a la solubilidad de la insulina, de tal forma que un aumento en la concentración de NaCl da como resultado una solubilidad reducida. Diversas insulinas, incluyendo análogos de insulina, tienen una solubilidad aparente diferente. Por lo tanto, la cantidad de NaCl que puede estar presente en la formulación sin afectar de manera adversa a la solubilidad diferirá entre insulinas. Por ejemplo, la insulina glulisina (por ejemplo, Apidra® insulina glulisina) es más soluble que la insulina aspart (por ejemplo, NovoLog® insulina aspart), y por lo tanto tolera más NaCl en la formulación. Por comparación, la insulina lispro y la insulina regular son las menos solubles de las insulinas de acción rápida y típicamente no contienen NaCl en sus formulaciones.

También pueden incluirse otros componentes en las formulaciones de insulina. Muchas formulaciones de insulina, incluyendo formulaciones de insulina regular, insulina aspart e insulina lispro, contienen iones de Zn^{2+} , que promueven y estabilizan la formación de hexámeros. Aunque las formulaciones de insulina glulisina no contienen cinc, contienen polisorbato 20 (P20; Tween 20) como estabilizante de proteínas. Los tampones usados en las formulaciones de insulina de acción rápida pueden incluir, por ejemplo, tampón de fosfato de sodio dibásico y Trometamol (también conocido como Tris o THAM).

3. Coformulaciones de enzima degradante de hialuronano e insulina

Las composiciones que contienen una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano (tal como una hialuronidasa soluble, por ejemplo, rHuPH20) producen una composición de insulina de acción súper rápida que imitan más estrechamente a la liberación endógena (es decir, natural) postprandial de insulina de un sujeto no diabético en comparación solo con la insulina de acción rápida (véase, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos n.º US20090304665). Por lo tanto, las composiciones de insulina de acción súper rápida pueden usarse por sujetos diabéticos para controlar de manera más precisa los niveles de glucosa en sangre y reducir los picos hiperglucémicos, en comparación con solo insulinas de acción rápida, proporcionando de este modo un beneficio sustancial al paciente.

Las formulaciones multidosis de insulinas de acción rápida y formulaciones de enzimas degradantes de hialuronano, sin embargo, son incompatibles y la mezcla de las dos da típicamente como resultado una rápida pérdida de la estabilidad y la actividad de la enzima degradante de hialuronano además de una pérdida rápida de la solubilidad y estabilidad de la insulina. Hasta ahora, por lo tanto, la administración de una composición de acción súper rápida tiene que efectuarse inmediatamente después de combinar la insulina y la enzima degradante de hialuronano para prevenir la pérdida de la actividad. Esto no es práctico y es una carga inaceptable para el paciente diabético.

Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan coformulaciones estables de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano (tal como una hialuronidasa soluble, por ejemplo, rHuPH20). Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden usarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de la diabetes mellitus, en particular para el control de los niveles de glucosa en sangre postprandiales. Las coformulaciones estables incluyen aquellas que son formulaciones multidosis que pueden proporcionarse en un vial, jeringa, bolígrafo, reservorio para una bomba o en un sistema de bucle cerrado, o cualquier otro envase adecuado.

a. Requisitos de estabilidad opuestos

Las principales barreras que previenen el desarrollo de coformulaciones estables de insulina y enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas solubles (por ejemplo, rHuPH20), incluyen la cristalización y precipitación de insulinas de acción rápida a temperaturas refrigeradas, y la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano a temperaturas elevadas. Típicamente, los excipientes y condiciones que previenen normalmente dichos resultados son diferentes para los dos agentes activos. Algunos excipientes y condiciones que son óptimos para mantener la solubilidad y estabilidad de las formulaciones de insulina pueden tener un efecto negativo en la estabilidad y actividad de las enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas solubles (por ejemplo, rHuPH20).

Por el contrario, los excipientes y condiciones que son óptimos para la estabilidad de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) tienen un efecto negativo en la estabilidad o solubilidad de las insulinas.

5 Solamente la mezcla de las formulaciones de insulina existentes, incluyendo análogos de insulina de acción rápida, y las formulaciones existentes de hialuronidasas solubles, tales como rHuPH20, da como resultado una formulación que no es estable en almacenamiento refrigerado de larga duración, o almacenamiento a temperatura ambiental o a temperatura elevada. Esto se debe a la rápida agregación de rHuPH20 y a la pérdida de actividad enzimática, así como a una pérdida de la actividad de insulina. Estos efectos perjudiciales son el resultado de múltiples excipientes y
10 condiciones incompatibles, incluyendo, pero sin limitación, el tipo y la concentración de los conservantes, la concentración de NaCl, la concentración de cinc, el pH y la temperatura de almacenamiento. Por lo tanto, la identificación de formulaciones en las que ambos agentes permanecen solubles, estables y activas es extremadamente complicada.

15 **i. Conservantes**

Se incluyen conservantes en formulaciones de insulina multidosis para prevenir la contaminación microbiana, que puede introducirse en la formulación mediante el acceso repetido al vial, cartucho de bolígrafo, u otro envase multidosis que contiene la formulación. Los conservantes tienen que estar presentes típicamente a concentraciones
20 suficientes para cumplir con las reglas regulatorias. Por ejemplo, los requisitos regulatorios afirman que la eficacia antimicrobiana de la formulación tiene que cumplir con los requisitos de la prueba de eficacia de conservantes (PET) de los mercados objetivo. Los requisitos de la PET de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y de la Farmacopea Europea (EP) difieren considerablemente, imponiendo restricciones adicionales en el desarrollo de formulaciones multidosis.

25 Las formulaciones de insulina comercializadas incluyen típicamente fenol, meta-cresol (m-cresol) y/o metilparabeno. Estos compuestos no solo sirven como agentes antimicrobianos eficaces, sino también pueden actuar para estabilizar las formas hexaméricas de las moléculas de insulina. Sin embargo, la concentración y el tipo de conservante usado en las formulaciones de insulina es importante. Por ejemplo, aunque los compuestos fenólicos
30 pueden estabilizar a las moléculas de insulina hexaméricas a concentraciones óptimas, la solubilidad de la insulina se reduce a medida que la concentración del conservante aumenta. Por lo tanto, la concentración de conservante en las formulaciones de insulina es crítica tanto para la estabilidad como para la solubilidad, así como para proporcionar actividad antimicrobiana esencial.

35 Aunque son un componente necesario, los conservantes representan un problema significativo en el desarrollo de formulaciones estables, multidosis de proteínas porque inducen típicamente la agregación de la proteína en solución acuosa. Por ejemplo, los conservantes tales como fenol, m-cresol, y alcohol bencílico han demostrado inducción de la agregación de hormona de crecimiento humano (Maa y Hsu (1996) *Int. J. Pharm.* 140:155-168), receptor de interleucina 1 recombinante (Remmele (1998) *Pharm. Res.* 15:200-208), factor de crecimiento insulínico I humano (Fransson (1997) *Pharm. Res.* 14:606-612), rhIFN- γ (Lam (1997) *Pharm. Res.* 14:725-729) y citocromo c (Singh et al. (2011) *J. Pharm. Sci.*, 100:1679-89). El efecto desestabilizante que tienen los conservantes sobre las proteínas en
40 solución ha sido un factor limitante para el desarrollo de formulaciones multidosis, y hasta la fecha, la mayoría de los agentes terapéuticos de proteínas se han formulado para un solo uso.

45 Al igual que la mayoría de los otros agentes terapéuticos proteínicos, la hialuronidasa PH20, tales como rHuPH20, pierde rápidamente su actividad en presencia de conservantes, probablemente debido al desplegamiento de la proteína y a la posterior formación de agregado. Por ejemplo, tal como se muestra en los ejemplos del presente documento, los conservantes reducen la actividad enzimática de PH20, particularmente a temperaturas elevadas. Los resultados en el presente documento demuestran mediante dispersión dinámica de luz (DLS), calorimetría de barrido diferencial (DSC) y otras técnicas de caracterización fisicoquímicas que la temperatura de fusión de la
50 enzima degradante de hialuronano rHuPH20 ejemplar se reduce significativamente cuando se añaden conservantes fenólicos, tales como m-cresol, a la formulación. Por ejemplo, la temperatura de desplegamiento de rHuPH20 se reduce de 44 °C a 24 °C. La menor temperatura de desplegamiento de PH20 da lugar a una agregación aumentada de PH20, especialmente a temperaturas elevadas, y a una actividad enzimática reducida.

55 Como se observa anteriormente, estos compuestos fenólicos, tales como fenol, m-cresol, y parabenos, son los mismos conservantes usados en formulaciones de insulina. El efecto desestabilizante se debe probablemente a la naturaleza hidrófoba de los conservantes fenólicos. La hidrofobicidad de los compuestos fenólicos puede dar lugar a la interacción con rHuPH20 a través de unión no específica a la proteína, en última instancia alterando la integridad estructural de rHuPH20. Esto se traduce en una pérdida significativa de actividad enzimática de rHuPH20 en
60 presencia de conservantes.

Tal como se demuestra en los ejemplos en el presente documento, a medida que aumenta el nivel de conservante fenólico (por ejemplo, fenol, m-cresol y metilparabeno), y/o aumenta la temperatura, también aumenta el impacto
65 negativo en la actividad enzimática de rHuPH20. Por ejemplo, la actividad enzimática de rHuPH20 se redujo significativamente después de una semana de incubación a 35 °C cuando el nivel general de conservante es

relativamente elevado (> 0,2 %). A temperatura ambiente y menores concentraciones de conservante, la enzima mantiene su actividad relativamente bien durante al menos un mes. Además, el tipo de compuesto fenólico también tiene impacto en la actividad de rHuPH20, de tal forma que m-cresol es el más perjudicial para la actividad de rHuPH20, seguido de fenol y después de metilparabeno. Sin embargo, el metilparabeno, aunque es el menos

- 5 perjudicial para la actividad de rHuPH20 de los compuestos fenólicos, también es el menos eficaz como antimicrobiano, y por lo tanto no es un conservante óptimo. Otros conservantes, tales como timerosal y sales de clorhexidina, parecen más compatibles con rHuPH20 pero no están tan ampliamente aceptados. Por lo tanto, las formulaciones que contienen estos conservantes no tradicionales afrontan obstáculos regulatorios adicionales.
- 10 El efecto perjudicial de los conservantes en la actividad enzimática de la enzima degradante de hialuronano rHuPH20 ejemplar se ve potenciado en gran medida a temperaturas elevadas. Tal como se muestra en los Ejemplos, Los conservantes fenólicos tienen un efecto negativo en la temperatura de fusión (T_f) de la enzima. Por ejemplo, la T_f para rHuPH20 descendió desde por encima de 40 °C en ausencia de conservante, hasta menos de 26 °C en presencia de, por ejemplo, m-cresol al 0,25 %. Por lo tanto, la T_f de rHuPH20 se reduce significativamente
- 15 cuando se añade conservante a rHuPH20 en solución. Como resultado, a temperaturas elevadas, la hialuronidasa soluble se despliega. Tal como se muestra en los Ejemplos, esta desnaturalización y posterior agregación se refleja en el tamaño aumentado de las moléculas de rHuPH20 en presencia de conservantes a temperaturas elevadas.

- 20 Por lo tanto, los conservantes, aunque son necesarios por sus actividades antimicrobianas y útiles por su efecto estabilizante en la insulina hexamérica, pueden tener un efecto perjudicial en la estabilidad y la actividad de las enzimas degradantes de hialuronano, tales como rHuPH20, y en la solubilidad de la insulina.

ii. NaCl y pH

- 25 Otro reto particular en el desarrollo de coformulaciones estables de insulina y enzimas degradantes de hialuronano (por ejemplo, rHuPH20) es el hecho de que el pH óptimo y los intervalos de concentración de NaCl para la solubilidad de la insulina son diferentes al pH óptimo y los intervalos de concentración de NaCl para rHuPH20. Por ejemplo, la solubilidad de la insulina y los análogos de insulina tiene a aumentar con un pH mayor (por ejemplo, > 7,2) y menor concentración de NaCl (por ejemplo, < 140 mM), condiciones que típicamente tienen un efecto
- 30 perjudicial en la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano ejemplar, rHuPH20, particularmente a temperaturas elevadas y durante su almacenamiento a largo plazo. Esta diferencia se exagera aún más en presencia de conservantes, que tienden a reducir la solubilidad de la insulina y la estabilidad de rHuPH20.

- 35 La solubilidad aparente de la insulina regular y de los análogos de insulina de acción rápida varía, aumentando la solubilidad de insulina regular, que es la menos soluble, a insulina lispro, después insulina aspart y finalmente insulina glulisina, que es la más soluble. La solubilidad se relaciona directamente con la tolerancia a NaCl en la formulación, de tal forma que no hay NaCl presente en las soluciones comerciales que contienen insulina regular e insulina lispro, está presente una pequeña cantidad de NaCl (10 mM) en las formulaciones comerciales de insulina aspart, y está presente una cantidad mayor de NaCl (85 mM) en las formulaciones comerciales de insulina glulisina.

- 40 El aumento de la concentración de NaCl de las formulaciones de insulina puede dar como resultado la cristalización/agregación de la insulina, particularmente a temperaturas bajas. La solubilidad también se ve afectada en gran medida por el NaCl. Tal como se demuestra en los ejemplos, cuando la concentración de NaCl de las soluciones de insulina refrigeradas aumenta de 50 mM a 140 mM, la solubilidad de la insulina regular, insulina aspart
- 45 e insulina lispro se redujo significativamente. Tal como se demuestra en los ejemplos, sin embargo, lo contrario es cierto para la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano ejemplar, rHuPH20. La estabilidad de rHuPH20 en solución a temperaturas elevadas (por ejemplo, de 25 °C y 30 °C) se reduce en gran medida con el paso del tiempo a medida que la concentración de NaCl se reduce de 140 mM a 50 mM.

- 50 La solubilidad de la insulina también se ve afectada en gran medida por el pH. De manera similar a los efectos de concentraciones mayores de NaCl en la solubilidad de la insulina, se observó un efecto negativo similar en la solubilidad de la insulina reduciendo el pH de 7,6 a 6,6. Por lo tanto, a bajo pH y NaCl elevado, la solubilidad de la insulina se reduce enormemente. Por el contrario, la solubilidad de la insulina es máxima a bajo NaCl y alto pH. De manera similar a los requisitos opuestos de concentración de NaCl entre la insulina y PH20, los requisitos de pH
- 55 también son opuestos. La estabilidad de rHuPH20 en solución a temperaturas elevadas (por ejemplo, de 25 °C y 30 °C) se reduce en gran medida con el paso del tiempo a medida que aumenta el pH de 7,0 a 7,6. A temperaturas refrigeradas, rHuPH20 es relativamente estable independientemente del pH y la concentración de NaCl.

- 60 Por lo tanto, la concentración de NaCl y el pH óptimos para la solubilidad de la insulina y la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, rHuPH20) parecen ser incompatibles. La solubilidad de la insulina es máxima a mayor pH y menor concentración de NaCl. Estas condiciones, sin embargo, son perjudiciales para la enzima degradante de hialuronano ejemplar, rHuPH20, que pierde estabilidad a mayor pH y menor concentración de NaCl. La estabilidad de rHuPH20 puede aumentarse aumentando las concentraciones de NaCl y disminuyendo el pH. Sin embargo, dichas condiciones tienen un efecto negativo en la solubilidad de la insulina y análogos de insulina,
- 65 que se precipitan a menor pH y alta concentración de NaCl. De este modo, uno de los mayores retos para el desarrollo de coformulaciones estables de insulina y una enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, rHuPH20

u otra enzima degradante de hialuronano) es identificar una concentración de NaCl y un pH en el que la insulina permanezca soluble y activa y la enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, rHuPH20) permanezca estable y activa. Esto se ha logrado en el presente documento.

5 b. Coformulación compatible

Los requisitos opuestos para la insulina y la hialuronidasa, tal como hialuronidasa PH20, para su estabilidad significan que hay que equilibrar diversos parámetros para optimizar la compatibilidad en una coformulación. Las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento contienen el equilibrio necesario de conservantes, sal (por ejemplo, NaCl), pH, estabilizante (o estabilizantes), y/o tampón para retener niveles aceptables de actividad de enzima degradante de hialuronano y de solubilidad y actividad de insulina. Tal como se ha discutido anteriormente, los retos para identificar este equilibrio fueron múltiples. En el primer caso, los conservantes, tales como conservantes fenólicos, que son necesarios como agentes antibacterianos en formulaciones multidosis, tienen efectos desestabilizantes en las enzimas degradantes de hialuronano, tales como rHuPH20, dando como resultado una rápida pérdida de actividad. En segundo lugar, las concentraciones de NaCl y el pH óptimos para la solubilidad y estabilidad de la insulina son muy diferentes a aquellos para la estabilidad de las enzimas degradantes de hialuronano. La solubilidad de la insulina es máxima a mayor pH y menor concentración de NaCl. Estas condiciones, sin embargo, son perjudiciales para la enzima degradante de hialuronano ejemplar, rHuPH20, que pierde estabilidad a mayor pH y menor concentración de sal. Esta inestabilidad de rHuPH20 se exagera aún más en presencia de conservantes. La estabilidad de rHuPH20 puede aumentarse aumentando las concentraciones de NaCl y disminuyendo el pH. Sin embargo, dichas condiciones tienen un efecto negativo en la solubilidad de la insulina y análogos de insulina, que se precipitan a menor pH y alta concentración de sal.

Por lo tanto, la identificación de condiciones en las que tanto la enzima degradante de hialuronano como la insulina de acción rápida permanezcan solubles, estables y activas es extremadamente complicada. Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento, sin embargo, proporcionan estas condiciones. No solo se identifican combinaciones óptimas de sal (por ejemplo, NaCl), pH y conservante, sino que se identifican estabilizantes y tampones adicionales que, cuando se combinan entre sí y, en algunos casos, la sal, el pH y los conservantes descritos, estabilizan adicionalmente a la enzima degradante de hialuronano y a la insulina así como mantienen la solubilidad de la insulina. Por ejemplo, en el presente documento se observa que Lys-Lys es un estabilizante que en algunos casos, y con algunos análogos de insulina, puede usarse como sustituto del NaCl de tal forma que pueden usarse concentraciones menores o nulas de NaCl en la formulación a la vez que se retiene la actividad enzimática y la solubilidad de la insulina.

Las siguientes secciones describen enzimas degradantes de hialuronano e insulinas ejemplares para su inclusión en las formulaciones o coformulaciones, formulaciones y coformulaciones estables ejemplares, métodos para evaluar la estabilidad y actividad de las formulaciones y coformulaciones, y métodos para usar las formulaciones o coformulaciones en diversas enfermedades y afecciones.

40 C. ENZIMAS DEGRADANTES DE HIALURONANO

En el presente documento se proporcionan formulaciones estables de una enzima degradante de hialuronano que es una hialuronidasa. También se proporcionan en el presente documento coformulaciones estables que contienen una insulina y una enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, la descripción y los ejemplos en el presente documento muestran que las coformulaciones estables de una insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, pueden producirse a pesar de que cada una individualmente tiene requisitos opuestos para la estabilidad y actividad. Esto se ejemplifica en el presente documento con PH20 (por ejemplo, rHuPH20), pero puede generalizarse a otras enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas solubles u otros polipéptidos de PH20.

En particular, en el presente documento se proporcionan formulaciones o coformulaciones que contienen una enzima degradante de hialuronano que es una hialuronidasa, tal como una hialuronidasa troncada (por ejemplo, troncada en C-terminal) que carece de la totalidad o una parte de un motivo de anclaje de GPI. Dichos polipéptidos de hialuronidasa pueden expresarse de manera recombinante y secretarse por las células en el medio tras la expresión por parte de las mismas. Por obra de la secreción en el medio, las hialuronidasas que normalmente se asocian con la membrana celular, cuando están troncadas, pueden existir como productos de proteína solubles. Se encuentra dentro de la capacidad de un experto en la materia generar y/o expresar enzimas degradantes de hialuronano tal como se proporcionan en el presente documento o conocidas en la técnica, y producir formulaciones o coformulaciones estables basándose en la descripción y las enseñanzas en el presente documento.

Las enzimas degradantes de hialuronano actúan para degradar el hialuronano escindiendo los polímeros de hialuronano, que están compuestos de unidades de disacáridos repetidas, ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidos mediante enlaces alternos β -1 \rightarrow 4 y β -1 \rightarrow 3 glucosídicos. Las cadenas de hialuronano pueden alcanzar aproximadamente 25.000 repeticiones de disacáridos o más de longitud y los polímeros de hialuronano pueden variar en tamaño de aproximadamente 5.000 a 20.000.000 Da *in vivo*. El hialuronano, también denominado ácido hialurónico o hialuronato, es un glucosaminoglucano no sulfatado que está ampliamente

distribuido en los tejidos conectivo, epitelial, y neural. El hialuronano es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Al catalizar la hidrólisis del hialuronano, las enzimas degradantes de hialuronano disminuyen la viscosidad del hialuronano, aumentando de este modo la permeabilidad tisular y aumentando la velocidad de absorción de fluidos administrados por vía parenteral. Como tales, las enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas, se han usado, por ejemplo, como agentes de difusión o dispersión en conjunción con otros agentes, fármacos y proteínas para potenciar su dispersión y administración.

Por consiguiente, las enzimas degradantes de hialuronano incluyen cualquier enzima que tenga la capacidad de catalizar la escisión de una cadena de disacáridos o polímero de hialuronano. En algunos ejemplos, la enzima degradante de hialuronano escinde el enlace β -1 \rightarrow 4 glucosídico en la cadena o polímero de hialuronano. En otros ejemplos, la enzima degradante cataliza la escisión del enlace β -1 \rightarrow 3 glucosídico en la cadena o polímero de hialuronano. Los ejemplos de enzimas degradantes de hialuronano en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento son hialuronidasas que se secretan en el medio cuando se expresan a partir de un sistema de expresión celular, incluyendo hialuronidasas naturales que no contienen anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) o hialuronidasas truncadas que carecen de uno o más aminoácidos del anclaje de GPI o hialuronidasas que de otro modo no se asocian con la membrana celular cuando se expresan a partir de las mismas. Dichas hialuronidasas pueden producirse de manera recombinante o de manera sintética.

Las enzimas degradantes de hialuronano proporcionadas en las coformulaciones del presente documento incluyen también variantes alélicas o de especie u otras variantes, de una enzima degradante de hialuronano tal como se describen en el presente documento. Por ejemplo, las enzimas degradantes de hialuronano pueden contener una o más variaciones en su secuencia primaria, tales como sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Una variante de una enzima degradante de hialuronano muestra generalmente al menos o aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia en comparación con la enzima degradante de hialuronano que no contiene la variación. Puede incluirse cualquier variación en la enzima degradante de hialuronano para los fines del presente documento siempre que la enzima retenga la actividad de hialuronidasa, tal como al menos o aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de la actividad de una enzima degradante de hialuronano que no contiene la variación (medida mediante ensayos *in vitro* y *in vivo* bien conocidos en la técnicas y descritos en el presente documento).

Varias formas de enzimas degradantes de hialuronano, incluyendo hialuronidasas se han preparado y aprobado para uso terapéutico en sujetos, incluyendo seres humanos. Por ejemplo, las preparaciones de hialuronidasa de origen animal incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada, y Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular bovina. Hylenex® (Baxter) es una hialuronidasa recombinante humana producida mediante la modificación por ingeniería genética de células de ovario de hámster chino (CHO) que contienen ácido nucleico que codifica un polipéptido de PH20 humano truncado (denominado rHuPH20). Se entiende que cualquier enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa puede incluirse en las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 7.767.429, y las Publicaciones de Estados Unidos n.º 20040268425 y 20100143457).

Típicamente, para su uso en las formulaciones y coformulaciones del presente documento, se usa una enzima degradante de hialuronano humana, tal como PH20 humana y en particular una PH20 humana truncada en C-terminal, tal como se describe en el presente documento. Aunque pueden utilizarse enzimas degradantes de hialuronano, tales como PH20, de otros animales, dichas preparaciones son potencialmente inmunogénicas, ya que son proteínas animales. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demuestra sensibilización previa secundaria a alimentos ingeridos, y ya que estas son 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, pueden prepararse para tener inmunogenicidad reducida. Dichas modificaciones se encuentran dentro de la capacidad de un experto en la materia y pueden incluir, por ejemplo, la eliminación y/o reemplazo de uno o más epítopos antigénicos en la molécula.

Las enzimas degradantes de hialuronano, a saber, hialuronidasas (por ejemplo, PH20), usadas en las formulaciones y coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden producirse de manera recombinante o pueden purificarse o purificarse parcialmente a partir de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, de extractos de testículos. Los métodos para la producción de proteínas recombinantes, incluyendo enzimas degradantes de hialuronano recombinantes, se proporcionan en otras partes del presente documento y se conocen bien en la técnica.

1. Hialuronidasas

Las hialuronidasas son miembros de una gran familia de enzimas degradantes de hialuronano. Hay tres clases generales de hialuronidasas: hialuronidasas de tipo mamífero, hialuronidasas bacterianas e hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Dichas enzimas pueden usarse en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento.

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 β -1 \rightarrow 4 glucosídico del hialuronano en diversas longitudes de oligosacárido tales como tetrasacáridos y hexasacáridos.

5 Estas enzimas tienen actividades tanto hidrolíticas como de transglucosidasa, y pueden degradar al hialuronano y a los sulfatos de condroitina (CS), generalmente C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero sin limitación, hialuronidasas de vaca (bovinas) (SEQ ID NO: 10, 11 y 64 y BH55 (Patentes de Estados Unidos n.º 5.747.027 y 5.827.721)), oveja (*Ovis aries*) (SEQ ID NO: 26, 27, 63 y 65), avispa de chaqueta amarilla (SEQ ID NO: 12 y 13), abeja melífera (SEQ ID NO: 14), avispa de cabeza blanca (SEQ ID NO: 15), avispa papelera (SEQ ID NO: 10 16), ratón (SEQ ID NO: 17-19, 32), cerdo (SEQ ID NO: 20-21), rata (SEQ ID NO: 22-24, 31), de conejo (SEQ ID NO: 25), orangután (SEQ ID NO: 28), mono cinomolgo (SEQ ID NO: 29), cobaya (SEQ ID NO: 30), de chimpancé (SEQ ID NO: 185), mono rhesus (SEQ ID NO: 186) e hialuronidasas humanas.

15 Las hialuronidasas de mamífero pueden subdividirse adicionalmente en aquellas que son neutras activas, encontradas predominantemente en extractos de testículos, y ácidas activas, encontradas predominantemente en órganos, tales como el hígado. Las hialuronidasas activas neutras ejemplares incluyen PH20, incluyendo, pero sin limitación, PH20 derivada de diferentes especies, tales como ovinas (SEQ ID NO: 27), bovinas (SEQ ID NO: 11) y humanas (SEQ ID NO: 1). PH20 humana (también conocida como SPAM1 o proteína de superficie de esperma PH20), está generalmente unida a la membrana plasmática a través de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI). 20 Está implicada naturalmente en la adhesión espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración del esperma en la capa de las células del cúmulo digiriendo el ácido hialurónico. Los ejemplos de hialuronidasas usadas en las coformulaciones en el presente documento son hialuronidasas neutras activas.

25 Aparte de PH20 humana (también denominada SPAM1), se han identificado cinco genes similares a hialuronidasas en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y HYALP1. HYALP1 es un seudogén, y HYAL3 (SEQ ID NO: 38) no ha demostrado poseer actividad enzimática para cualquier sustrato conocido. HYAL4 (polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 39) es una condroitinasa y muestra poca actividad hacia el hialuronano. HYAL1 (polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 36) es la enzima activa en ácido prototípica y PH20 (polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 1) es la enzima activa neutra prototípica. Las hialuronidasas 30 activas en ácido, tales como HYAL1 e HYAL2 (polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 37) carece generalmente de actividad catalítica a pH neutro (es decir, pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* a pH 4,5 (Frost et al. (1997) Anal. Biochem. 251:263-269). HYAL2 es una enzima activa en ácido con una actividad específica muy baja *in vitro*. Las enzimas similares a hialuronidasa también pueden caracterizar por aquellas que están unidas generalmente a la membrana plasmática a través de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) tales como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, et al., (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100(8):4580-5), y aquellas que son generalmente solubles, tales como HYAL1 humana (Frost et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1):10-5).

PH20

40 PH20, al igual que otras hialuronidasas de mamífero, es una endo- β -N-acetil-hexosaminidasa que hidroliza el enlace β -1 \rightarrow 4 glucosídico del ácido hialurónico en varias longitudes de oligosacáridos tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Tienen actividad tanto hidrolítica como de transglucosidasa y pueden degradar al ácido hialurónico a los sulfatos de condroitina, tales como C4-S y C6-S. PH20 está implicada naturalmente en la adhesión 45 espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración del esperma en la capa de las células del cúmulo digiriendo el ácido hialurónico. PH20 se localiza en la superficie del esperma, y en el acrosoma derivado de lisosomas, donde se une a la membrana acrosómica interna. PH20 de la membrana plasmática tiene actividad de hialuronidasa solo a pH neutro, mientras que PH20 de la membrana acrosómica interna tiene actividad a pH tanto neutro como ácido. Además de ser una hialuronidasa, PH20 parece ser un receptor para la señalización celular inducida por HA, y un receptor para la zona pelúcida que rodea al ovocito. 50

Las proteínas PH20 ejemplares incluyen, pero sin limitación, PH20 humana (polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 1, polipéptido maduro expuesto en la SEQ ID NO: 2), bovina (SEQ ID NO: 11 y 64), de conejo (SEQ ID NO: 25), ovina (SEQ ID NO: 27, 63 y 65), mono cinomolgo (SEQ ID NO: 29), cobaya (SEQ ID NO: 30), de rata (SEQ ID NO: 31), de ratón (SEQ ID NO: 32), de chimpancé (SEQ ID NO: 185) y de mono rhesus (SEQ ID NO: 186). 55

PH20 bovina es un polipéptido precursor de 553 aminoácidos (SEQ ID NO: 11). El alineamiento de PH20 bovina con PH20 humana muestra una homología únicamente débil, existiendo múltiples huecos desde el aminoácido 470 hasta el extremo carboxilo respectivo debido a la ausencia de un anclaje de GPI en el polipéptido bovino (véase, por ejemplo, Frost GI (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4: 427-440). De hecho, no se predicen anclajes de GPI evidentes 60 en muchas otras especies de PH20 aparte de seres humanos. Por lo tanto, los polipéptidos de PH20 producidos a partir de ovinos y bovinos existen de manera natural como formas solubles. Aunque PH20 bovina existe unida de manera débil a la membrana plasmática, no está anclada a través de un anclaje sensible a fosfolipasa (Lalancette et al. (2001) Biol Reprod. 65(2):628-36). Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa de testículo bovino en forma de un extracto para uso clínico (Wydase®, Hyalase®). 65

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

Aunque PH20 humana es una hialuronidasa activa neutra cuando existe en la membrana plasmática mediante un anclaje de GPI, muestra actividad a pH tanto neutro como ácido cuando se expresa en la membrana acrosómica interna. Parece que PH20 contiene dos sitios catalíticos en distintas regiones del polipéptido: las regiones de péptido 1 y de péptido 3 (Cherr et al., (2001) *Matrix Biology* 20:515-525). La región del péptido 1 de PH20, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 107-137 del polipéptido maduro expuesto en la SEQ ID NO: 2 y las posiciones 142-172 del polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 1, es necesaria para la actividad enzimática a pH neutro. Los aminoácidos en las posiciones 111 y 113 (correspondientes al polipéptido de PH20 maduro expuesto en la SEQ ID NO: 2) dentro de esta región parecen ser importantes para la actividad, ya que la mutagénesis mediante reemplazo de aminoácidos da como resultado polipéptidos de PH20 con un 3 % de actividad de hialuronidasa o actividad de hialuronidasa indetectable, respectivamente, en comparación con PH20 de tipo silvestre (Arming et al., (1997) *Eur. J. Biochem.* 247:810-814).

La región de péptido 3, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 242-262 del polipéptido maduro expuesto en la SEQ ID NO: 2, y las posiciones 277-297 del polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 1, parece ser importante para la actividad enzimática a pH ácido. Dentro de esta región, las posiciones de aminoácidos 249 y 252 del polipéptido de PH20 maduro parecen ser esenciales para la actividad, y la mutagénesis de una cualquiera de las 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. Las pruebas experimentales muestran que este sitio está localizado en la región de péptido 2, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 205-235 del polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 1 y las posiciones 170-200 del polipéptido maduro expuesto en la SEQ ID NO: 2. Esta región está altamente conservada entre hialuronidasas y es similar al motivo de unión a heparina. La mutación del resto de arginina en la posición 176 (correspondiente al polipéptido PH20 maduro expuesto en la SEQ ID NO: 2) a una glicina da como resultado un polipéptido con solo aproximadamente un 1 % de la actividad de hialuronidasa del polipéptido de tipo silvestre (Arming et al., (1997) *Eur. J. Biochem.* 247:810-814).

Hay siete sitios de glucosilación unidos a N potenciales en PH20 humano, en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 del polipéptido ejemplificado en la SEQ ID NO: 1. Debido a que los aminoácidos 36 a 464 de la SEQ ID NO: 1 parecen contener el dominio de hialuronidasa PH20 humana mínimamente activa, el sitio de glucosilación unido a N, N-490 no es necesario para una actividad de hialuronidasa adecuada. Hay seis enlaces disulfuro en PH20 humana. Dos enlaces disulfuro entre los restos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 del polipéptido ejemplificado en la SEQ ID NO: 1 (correspondiente a los restos C25 y C316, y C189 y C203 del polipéptido maduro expuesto en la SEQ ID NO: 2, respectivamente). Se forman cuatro enlaces disulfuro adicionales entre los restos de cisteína C376 y C387; entre C381 y C435; entre C437 y C443; y entre C458 y C464 del polipéptido ejemplificado en la SEQ ID NO: 1 (correspondiente a los restos C341 y C352; entre C346 y C400; entre C402 y C408; y entre C423 y C429 del polipéptido maduro expuesto en la SEQ ID NO: 2, respectivamente).

b. Hialuronidasas bacterianas

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

Las hialuronidasas ejemplares de bacterias para las coformulaciones proporcionadas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, enzimas degradantes de hialuronano en microorganismos, incluyendo cepas de *Arthrobacter*, *Bdellovibrio*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, y *Streptomyces*. Los ejemplos particulares de dichas enzimas incluyen, pero sin limitación *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); 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); cepa USA300 (SEQ ID NO: 81), *Streptococcus pneumoniae* (SEQ ID NO: 82); cepa ATCC BAA-255 / R6 (SEQ ID NO: 83); 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); 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 a la condroitina o al sulfato de condroitina (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 de tetra y hexasacárido. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces 1 \rightarrow 3 entre restos β -D-glucuronato y N-acetil-D-glucosamina en el hialuronato. Las hialuronidasas de sanguijuelas ejemplares incluyen, pero sin limitación, hialuronidasas de Hirudinidae (por ejemplo, *Hirudo medicinalis*), Erpobdellidae (por ejemplo, *Nepheleopsis obscura* y *Erpobdella punctata*), Glossiphoniidae (por ejemplo, *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 ejemplar de bacterias que tiene el mismo mecanismo de acción que la hialuronidasa de sanguijuela es la de la cianobacteria, *Synechococcus* sp. (cepa RCC307, SEQ ID NO: 97).

2. Enzimas degradantes de hialuronano truncadas u otras formas solubles

Las enzimas degradantes de hialuronano pueden existir en forma unida a membrana o asociada a membrana, o pueden secretarse al medio cuando se expresan a partir de células y de este modo existen en forma soluble. Para los fines del presente documento, las enzimas degradantes de hialuronano incluyen cualquier enzima degradante de hialuronano que cuando se expresa y secreta por células no se asocia con la membrana celular, y por lo tanto existen en forma soluble. Las enzimas degradantes de hialuronano incluyen, pero sin limitación, hialuronidasas, incluyendo hialuronidasas no humanas (por ejemplo, hialuronidasas animales o bacterianas), tales como PH20 bovina o PH20 ovina, e hialuronidasas humanas, tales como Hyall, o formas truncadas de hialuronidasas no humanas o humanas asociadas a membrana, en particular, formas truncadas de PH20 humana, variantes alélicas de las mismas y otras variantes de las mismas. Los ejemplos de enzimas degradantes de hialuronano en las coformulaciones en el presente documento son formas truncadas de una enzima degradante de hialuronano que carecen de uno o más restos de aminoácidos de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) y que retienen actividad de hialuronidasa. En un ejemplo, la hialuronidasa humana PH20, que normalmente está anclada a membrana a través de un ancla de GPI, puede hacerse soluble mediante truncamiento y eliminación de una porción del anclaje de GPI en el extremo C-terminal.

Por lo tanto, en algunos casos, una enzima degradante de hialuronano que normalmente está anclada a GPI (tal como, por ejemplo, PH20 humana) se hace soluble mediante truncamiento en el extremo C-terminal. Dicho truncamiento puede eliminar la totalidad de la secuencia de señal de unión al anclaje de GPI, o puede eliminar solo parte de la secuencia de señal de anclaje a GPI. El polipéptido resultante, sin embargo, es soluble. En los casos donde la enzima degradante de hialuronano retiene una porción de la secuencia de señal de unión al anclaje de GPI, pueden retenerse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos de aminoácidos en la secuencia de señal de unión al anclaje de GPI, siempre que el polipéptido sea soluble (es decir, se secreta cuando se expresa de células) y activo. Un experto en la materia puede determinar si un polipéptido está anclado a GPI usando métodos bien conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, el uso de algoritmos conocidos para predecir la presencia y localización de la secuencia de señal de unión a anclaje de GPI y del sitio ω , y llevar a cabo análisis de solubilidad antes y después de la digestión con fosfolipasa C (PI-PLC) o D (PI-PLD) específica de fosfatidilinositol.

Una hialuronidasa soluble ejemplar es PH20 de cualquier especie, tal como cualquiera expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 30-32, 63-65 y 185-186, o formas truncadas de las mismas que carecen de la totalidad o una parte del anclaje de GPI C-terminal, siempre que la hialuronidasa sea soluble y retenga actividad de hialuronidasa. Los ejemplos de hialuronidasas solubles que están truncadas en C-terminal y que carecen de la totalidad o una parte de la secuencia de señal de unión a anclaje de GPI incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de PH20 de origen de primate, tales como, por ejemplo, polipéptidos de PH20 de humano y de chimpancé. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 solubles pueden producirse mediante truncamiento C-terminal de cualquiera de los polipéptidos maduros o precursores expuestos en las SEQ ID NO: 1, 2 o 185, o variantes alélicas u otras de los mismos, incluyendo fragmentos activos de los mismos, en donde el polipéptido resultante es soluble y carece de la totalidad o parte de los restos de aminoácidos de la secuencia de señal de unión al anclaje de GPI. También se incluyen entre las hialuronidasas solubles variantes alélicas u otras variantes de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 11, 25, 27, 30-32, 63-65 y 185-186, o formas truncadas de las mismas. Las variantes alélicas y otras variantes son conocidas para un experto en la materia, e incluyen polipéptidos que tienen un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o más identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 11,

25, 27, 30-32, 63-65 y 185-186, o formas truncadas de las mismas. Las variantes de aminoácidos incluyen mutaciones conservativas y no conservativas. Se entiende que los restos que son importantes o de otro modo necesarios para la actividad de una hialuronidasa, tal como cualquiera descrita anteriormente o conocida para los expertos en la materia, son generalmente invariantes y no pueden cambiarse. Estos incluyen, por ejemplo, restos del sitio activo. Por lo tanto, por ejemplo, los restos de aminoácidos 111, 113 y 176 (correspondientes a los restos en el polipéptido de PH20 expuesto en la SEQ ID NO: 2) de un polipéptido PH20 humano, o formas solubles de los mismos, son generalmente invariantes y no se alteran. Otros restos que confieren glucosilación y formación de enlace disulfuro requeridos para el plegamiento adecuado también pueden ser invariantes.

10 a. PH20 humana truncada en C-terminal

Un ejemplo de una hialuronidasa soluble es una PH20 humana truncada en C-terminal. Se han producido formas truncadas en C-terminal de PH20 humana recombinante y pueden usarse en las coformulaciones descritas en el presente documento. La producción de dichas formas solubles de PH20 se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 7.767.429 y las Solicitudes de Patente de Estados Unidos n.º US20040268425, US20050260186, US20060104968 y US20100143457.

Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 truncados en C-terminal incluyen polipéptidos que contienen al menos los aminoácidos 36-464 (la parte mínima necesaria para la actividad de hialuronidasa), o incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, por ejemplo, al menos un 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que incluye al menos los aminoácidos 36-464 de la SEQ ID NO: 1 y retienen actividad de hialuronidasa. Entre estos polipéptidos se incluyen polipéptidos de PH20 humana que carecen completamente de la totalidad de la secuencia de señal de unión a anclaje de GPI. Entre estos polipéptidos también se incluyen polipéptidos de PH20 que carecen de una porción de restos de aminoácidos contiguos de la secuencia de señal de unión al anclaje de GPI (denominado PH20 soluble extendida (esPH20); véase, por ejemplo, el documento US20100143457). Los polipéptidos de PH20 truncados en C-terminal pueden truncarse en 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 silvestre de longitud completa, tal como un polipéptido de tipo silvestre de longitud completa con una secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o 2, o variantes alélicas o de especie u otras variantes de las mismas. Por lo tanto, en lugar de tener un anclaje de GPI unido covalentemente al extremo C-terminal de la proteína en el ER y estar anclado a la cara externa de la membrana plasmática, estos polipéptidos se secretan cuando se expresan en células y son solubles.

Los polipéptidos de PH20 humanos truncados en C-terminal ejemplares proporcionados en el presente documento incluyen al menos los aminoácidos 36-464 de SEQ ID NO: 1 y se truncan en 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 la SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo que muestra al menos un 85 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % de identidad de secuencia con el mismo y retiene actividad de hialuronidasa. La tabla 3 proporciona ejemplos no limitantes de polipéptidos de PH20 truncados en C-terminal ejemplares. En la tabla 3 a continuación, se proporcionan la longitud (en aminoácidos) de los polipéptidos precursores y maduros y el identificador de secuencia (SEQ ID NO) con el que se exponen las secuencias de aminoácidos ejemplares de los polipéptidos precursores y maduros de las proteínas de PH20 truncadas en C-terminal. El polipéptido de PH20 de tipo silvestre también se incluye en la tabla 3 para comparación. Por ejemplo, los polipéptidos de PH20 truncados en C-terminal ejemplares incluyen, pero sin limitación, polipéptidos expuestos en una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9, 47-48, 234-254, y 267-273, o un polipéptido que muestra al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9, 47-48, 234-254, y 267-273.

Tabla 3. Polipéptidos de PH20 truncados en C-terminal ejemplares

Polipéptido	Precursor (aminoácidos)	SEQ ID NO del precursor	Maduro (aminoácidos)	SEQ ID NO madura
tipo silvestre	509	1	474	2
SPAM1-SILF	500	223	465	267
SPAM1-VSIL	499	190	464	234
SPAM1-IVSI	498	224	463	268
SPAM1-FIVS	497	191	462	235
SPAM1-MFIV	496	225	461	269
SPAM1-TMFI	495	192	460	236
SPAM1-ATMF	494	226	459	270
SPAM1-SATM	493	193	458	237

Tabla 3. Polipéptidos de PH20 truncados en C-terminal ejemplares

Polipéptido	Precursor (aminoácidos)	SEQ ID NO del precursor	Maduro (aminoácidos)	SEQ ID NO madura
SPAM1-LSAT	492	227	457	271
SPAM1-TLSA	491	194	456	238
SPAM1-STLS	490	196	455	240
SPAM1-PSTL	489	195	454	239
SPAM1-SPST	488	228	453	272
SPAM 1-ASPS	487	197	452	241
SPAM1-NASP	486	229	451	273
SPAM1-YNAS	485	198	450	242
SPAM1-FYNA	484	199	449	243
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	200	441	244
SPAM1-PMET	475	201	440	245
SPAM1-PPME	474	202	439	246
SPAM1-KPPM	473	203	438	247
SPAM1-LKPP	472	204	437	248
SPAM1-FLKP	471	205	436	249
SPAM1-AFLK	470	206	435	250
SPAM1-DAFL	469	207	434	251
SPAM1-IDAF	468	208	433	252
SPAM1-CIDA	467	40	432	47
SPAM1-VCID	466	209	431	253
SPAM1-GVCI	465	200	430	254

b. rHuPH20

5 Un ejemplo de una forma truncada en C-terminal de la SEQ ID NO: 1 es un polipéptido del mismo que está truncado después del aminoácido 482 de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1. Dicho polipéptido puede generarse a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1-482 (expuestos en la SEQ ID NO: 3). Dicha molécula de ácido nucleico ejemplar se expone en la SEQ ID NO: 49. El procesamiento postraducciona elimina la secuencia de señal de 35 aminoácidos, dejando una PH20 humana recombinante soluble de 447 aminoácidos (SEQ ID NO: 4). Ya que se producen en medio de cultivo existe heterogeneidad en el extremo C-terminal de tal forma que el producto, denominado rHuPH20, incluye una mezcla de especies que pueden incluir una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 4-9 en diversas abundancias. Típicamente, rHuPH20 se produce en células que facilitan la N-glucosilación correcta para retener la actividad, tales como células CHO (por ejemplo, células DG44 CHO).

3. Glucosilación de enzimas degradantes de hialuronano

15 La glucosilación, incluyendo la glucosilación unida a N o a O, de algunas enzimas degradantes de hialuronano, incluyendo hialuronidasas, pueden ser importantes por su actividad catalítica y estabilidad. Mientras que alterar el tipo de glucano que modifica una glucoproteína puede tener efectos dramáticos en la antigenicidad, plegamiento estructural, solubilidad y estabilidad de una proteína, se cree que la mayoría de las enzimas no requieren de glucosilación para una actividad enzimática óptima. Para algunas hialuronidasas, la eliminación de la glucosilación unida a N puede dar como resultado una inactivación prácticamente completa de la actividad de hialuronidasa. Por lo tanto, para dichas hialuronidasas, la presencia de glucanos unidos a N es crítica para generar una enzima activa.

Los oligosacáridos unidos a N se encuentran dentro de varios tipos principales (oligomanosa, complejo, híbrido, sulfatado), todos los cuales tienen núcleos de (Man)₃-GlcNAc-GlcNAc unidos a través del nitrógeno de la amida de los restos de Asn que se encuentran dentro de secuencias -Asn-Xaa-Thr/Ser- (en donde Xaa no es Pro). Se ha comunicado la glucosilación en un sitio de -Asn-Xaa-Cys- para la proteína C de la coagulación. En algunos casos, una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, puede contener enlaces tanto N-glucosídicos como O-glucosídicos. Por ejemplo, PH20 tiene oligosacáridos unidos a O así como oligosacáridos unidos a N. Hay siete sitios de glucosilación unidos a N potenciales, en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humana ejemplificados en la SEQ ID NO: 1. Los restos de aminoácidos N82, N166 y N254 están ocupados por glucanos de tipo complejo mientras que los aminoácidos N368 y N393 están ocupados por glucanos de tipo alto en manosa. El resto de aminoácido N235 está ocupado por aproximadamente un 80 % de glucanos de tipo alto en manosa y un 20 % de glucanos de tipo complejo. Como se ha indicado anteriormente, la glucosilación unida a N en N490 no es necesaria para la actividad de hialuronidasa.

En algunos ejemplos, las enzimas degradantes de hialuronano para su uso en las coformulaciones proporcionadas se glucosilan en uno o en todos los sitios de glucosilación. Por ejemplo, para PH20 humana, o una forma soluble de la misma, 2, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glucosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de SEQ ID NO: 1 están glucosilados. En algunos ejemplos, las enzimas degradantes de hialuronano se glucosilan en uno o más sitios de glucosilación nativos. En general, las formas solubles de PH20 se producen usando sistemas de expresión de proteínas que facilitan la correcta N-glucosilación para asegurar que el polipéptido retiene la actividad, ya que la glucosilación es importante para la actividad catalítica y estabilidad de las hialuronidasas. Dichas células incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, células DG44 CHO).

En otros ejemplos, las enzimas degradantes de hialuronano se modifican en uno o más sitios de glucosilación no nativos para conferir glucosilación del polipéptido en uno o más sitios adicionales. En dichos ejemplos, la unión de restos de azúcar adicionales puede potenciar las propiedades farmacocinéticas de la molécula, tal como una semivida mejorada y/o una actividad mejorada.

En otros ejemplos, las enzimas degradantes de hialuronano, tales como PH20 o PH20 humana, incluidas en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento están parcialmente desglucosiladas (o polipéptidos parcialmente N-glucosilados) (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º US20100143457). Las glucosidasas, o glucósido hidrolasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico para generar dos azúcares más pequeños. Los principales tipos de N-glucanos en los vertebrados incluyen glucanos altos en manosa, glucanos híbridos y glucanos complejos. Hay varias glucosidasas que dan como resultado únicamente una desglucosilación parcial de proteínas, incluyendo: EndoF1, que escinde glucanos del tipo alto en manosa e híbridos; EndoF2, que escinde glucanos de tipo complejo biantenarios; EndoF3, que escinde glucanos complejos biantenarios y más ramificados; y EndoH, que escinde glucanos del tipo alto en manosa e híbridos. Por ejemplo, el tratamiento de PH20 (por ejemplo, una PH20 recombinante denominada rHuPH20) con una o todas las glucosidasas anteriores (por ejemplo, EndoF1, EndoF2, EndoF3 y/ EndoH) da como resultado una desglucosilación parcial. Estos polipéptidos de PH20 parcialmente desglucosilados pueden mostrar actividad enzimática de hialuronidasa que es comparable a los polipéptidos totalmente glucosilados. Por el contrario, el tratamiento de PH20 con PNGasaF, una glucosidasa que escinde a todos los N-glucanos, o con el inhibidor de GlcNAc fosfotransferasa (GPT) tunicamicina, da como resultado la desglucosilación completa de todos los N-glucanos y por lo tanto hace que PH20 sea enzimáticamente inactiva. Por lo tanto, aunque todos los sitios de glucosilación unidos a N (tales como, por ejemplo, aquellos en los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de PH20 humana, ejemplificada en la SEQ ID NO: 1) pueden estar glucosilados, el tratamiento con una o más glucosidasas puede hacer que el alcance de la glucosilación se reduzca en comparación con una hialuronidasa que no se digiere con una o más glucosidasas.

Por lo tanto, las enzimas degradantes de hialuronano parcialmente desglucosiladas, tales como hialuronidasas solubles parcialmente desglucosiladas, pueden producirse mediante digestión con una o más glucosidasas, en general una glucosidasa que no elimina todos los N-glucanos, sino que desglucosila solo parcialmente a la proteína. Las enzimas degradantes de hialuronano parcialmente desglucosiladas, incluyendo polipéptidos de PH20 soluble parcialmente desglucosilados, pueden tener un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 % del nivel de glucosilación de un polipéptido completamente glucosilado. En un ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de N-glucosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de SEQ ID NO: 1 están parcialmente desglucosilados, de tal forma que ya no contienen glucanos de tipo altos en manosa o complejos, sino que contienen al menos un resto de N-acetilglucosamina. En algunos ejemplos, 1, 2 o 3 de los sitios de N-glucosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166 y N254 de SEQ ID NO: 1 están desglucosilados, es decir, no contienen un resto de azúcar. En otros ejemplos, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glucosilación correspondientes a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de SEQ ID NO: 1 están glucosilados. Los restos de aminoácidos glucosilados contienen como mínimo un resto de N-acetilglucosamina. Típicamente, las enzimas degradantes de hialuronano parcialmente desglucosiladas, incluyendo polipéptidos de PH20 soluble parcialmente desglucosilados, muestran una actividad de hialuronidasa que es un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 1000 % o más de la actividad de hialuronidasa mostrada por el polipéptido completamente glucosilado.

4. Modificaciones de enzimas degradantes de hialuronano para mejorar sus propiedades farmacocinéticas

Las enzimas degradantes de hialuronano pueden modificarse para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, tales como aumentar sus semividas *in vivo* y/o actividades. La modificación de enzimas degradantes de hialuronano para su uso en las formulaciones o coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento o en cualquier composición, combinación y/o método proporcionado puede incluir unir, directa o indirectamente a través de un enlazador, tal como covalentemente o mediante otro enlace estable, un polímero, tal como dextrano, un resto de polietilenglicol (pegilación (PEG)) o de sialilo, u otros polímeros similares, tales como polímeros naturales o de azúcar.

Se sabe que la pegilación de agentes terapéuticos aumenta la resistencia a la proteólisis, aumentar la semivida en plasma, y disminuir la antigenicidad e inmunogenicidad. La unión covalente u otra estable (conjugación) de moléculas poliméricas, tales como un resto de polietilenglicol (PEG), a la enzima degradante de hialuronano puede por lo tanto conferir propiedades beneficiosas a la composición de enzima-polímero resultante. Dichas propiedades incluyen biocompatibilidad mejorada, extensión de la semivida (y de la actividad enzimática) en la sangre, células y/u otros tejidos en un sujeto, protección eficaz de la proteína frente a las proteasas y la hidrólisis, biodistribución mejorada, farmacocinética y/o farmacodinámica potenciada, y solubilidad en agua mejorada.

Los polímeros ejemplares que pueden conjugarse a la enzima degradante de hialuronano incluyen homopolímeros naturales y sintéticos, tales como polioles (es decir, poli-OH), poliaminas (es decir, poli-NH₂) y ácidos policarboxílicos (es decir, poli-COOH), y heteropolímeros adicionales, es decir, polímeros que comprenden uno o más grupos de acoplamiento diferentes, por ejemplo, un grupo hidroxilo y grupos amina. Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas de entre óxidos de polialquileno (PAO), tales como polialquilenglicoles (PAG), incluyendo polipropilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, éteres de PEG-glicidilo (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), polietilenglicoles ramificados (PEG), alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli-D,L-aminoácidos, anhídrido del ácido polietileno-comandélico, anhídrido del ácido poliestireno-comandélico, dextranos, incluyendo carboximetil-dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, hidrolizados de quitosano, almidones, tales como hidroxietil-almidones e hidroxipropil-almidones, glucógeno, agarosas y derivados de la misma, goma guar, pululano, inulina, goma xantana, carragenano, pectina, hidrolizados de ácido algínico y biopolímeros.

Típicamente, los polímeros son óxidos de polialquileno (PAO), tales como óxidos de polietileno, tal como PEG, típicamente mPEG, que, en comparación con polisacáridos, tales como dextrano, pululano y similares, tienen pocos grupos reactivos capaces de reticulación. Típicamente, los polímeros son moléculas poliméricas no tóxicas, tales como (m)polietilenglicol (mPEG) que pueden conjugarse covalentemente a la enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, a grupos de unión en la superficie de la proteína) usando química relativamente simple.

Las moléculas poliméricas adecuadas para la unión a la enzima degradante de hialuronano incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG, tales como metoxi-polietilenglicoles (mPEG), éteres de PEG-glicidilo (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), PEG ramificados, y óxido de polietileno (PEO) (véase, por ejemplo, Roberts et al., *Advanced Drug Delivery Review* 2002, 54: 459-476; Harris y Zalipsky, S (eds.) "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar et al., *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1):125-136, 2000; Harris, *Nature Reviews Drug Discovery* 2:214 (2003); y Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37):38118-24, 2004). La molécula polimérica puede ser de un peso molecular típicamente en el intervalo de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 60 kDa. En algunas realizaciones, la molécula polimérica que se conjuga a una proteína, tal como rHuPH20, tiene un peso molecular de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más de 60 kDa.

En la técnica se conocen diversos métodos para modificar polipéptidos uniendo covalentemente (conjugando) un PEG o derivado de PEG (es decir, "PEGilación") (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de Estados Unidos n.º 20060104968 y US 20040235734; las Patentes de Estados Unidos n.º 5.672.662 y U.S. 6.737.505). Las técnicas de PEGilación incluyen, pero sin limitación, enlazadores especializados y químicas de acoplamiento (véase, por ejemplo, Roberts et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476, 2002), la unión de múltiples restos de PEG a un solo sitio de conjugación (tales como mediante el uso de PEG ramificados; véase, por ejemplo, Guiotto et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), PEGilación de sitio específico y/o mono-PEGilación (véase, por ejemplo, Chapman et al., *Nature Biotech.* 17:780-783, 1999), y PEGilación enzimática de sitio dirigido (véase, por ejemplo, Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002) (véase, también por ejemplo, Lu y Felix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:127-138; Lu y Felix (1993) *Peptide Res.* 6:140-6, 1993; Felix et al. (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46:253-64; Benhar et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13398-404; Brumeanu et al. (1995) *J Immunol.* 154:3088-95; véase también, Caliceti et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). Los métodos y técnicas descritos en la técnica pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 PEG o derivados de PEG unidos a una sola molécula de proteína (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20060104968).

Se han descrito en la técnica numerosos reactivos para la PEGilación. Dichos reactivos incluyen, pero sin limitación, PEG activado por N-hidroxisuccinimidilo (NHS), mPEG de succinimidilo, mPEG2-N-hidroxisuccinimida, alfa-metilbutanoato de mPEG succinimidilo, propionato de mPEG succinimidilo, butanoato de mPEG succinimidilo, succinimidil éster del ácido carboximetil 3-hidroxi-butanoico de mPEG, propionato de PEG-succinimidilo homobifuncional, propionaldehído de PEG homobifuncional, butiraldehído de PEG homobifuncional, maleimida de PEG, hidrazida de PEG, p-nitrofenil-carbonato de PEG, carbonato de mPEG-benzotriazol, propionaldehído de PEG, butiraldehído de mPEG, butiraldehído de mPEG2 ramificado, acetil mPEG, mPEG piperidona, mPEG metilcetona, mPEG maleimida "sin enlazador", mPEG vinil sulfona, mPEG tiol, ortopiridiltioéster de mPEG, ortopiridil disulfuro de mPEG, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona PEG-NHS, acrilato PEG-NHS, fluoresceína PEG-NHS, y biotina PEG-NHS (véase, por ejemplo, Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Veronese et al, J. Bioactive Compatible Polymers 12:197-207, 1997; el documento U.S. 5.672.662; el documento U.S. 5.932.462; el documento U.S. 6.495.659; el documento U.S. 6.737.505; el documento U.S. 4.002.531; el documento U.S. 4.179.337; el documento U.S. 5.122.614; el documento U.S. 5.324.844; el documento U.S. 5.446.090; el documento U.S. 5.612.460; el documento U.S. 5.643.575; el documento U.S. 5.766.581; el documento U.S. 5.795.569; el documento U.S. 5.808.096; el documento U.S. 5.900.461; el documento U.S. 5.919.455; el documento U.S. 5.985.263; el documento U.S. 5.990.237; el documento U.S. 6.113.906; el documento U.S. 6.214.966; el documento U.S. 6.258.351; el documento U.S. 6.340.742; el documento U.S. 6.413.507; el documento U.S. 6.420.339; el documento U.S. 6.437.025; el documento U.S. 6.448.369; el documento U.S. 6.461.802; el documento U.S. 6.828.401; el documento U.S. 6.858.736; el documento U.S. 2001/0021763; el documento U.S. 2001/0044526; el documento U.S. 2001/0046481; el documento U.S. 2002/0052430; el documento U.S. 2002/0072573; el documento U.S. 2002/0156047; el documento U.S. 2003/0114647; el documento U.S. 2003/0143596; el documento U.S. 2003/0158333; el documento U.S. 2003/0220447; el documento U.S. 2004/0013637; el documento U.S. 2004/0235734; el documento U.S. 2005/0114037; el documento U.S. 2005/0171328; el documento U.S. 2005/0209416; el documento EP 1064951; el documento EP 0822199; el documento WO 01076640; el documento WO 0002017; el documento WO 0249673; el documento WO 05000360; el documento WO 9428024; y el documento WO 0187925).

D. FORMULACIONES DE ENZIMA DEGRADANTE DE HIALURONANO ESTABLES

En el presente documento se proporcionan formulaciones estables de una enzima degradante de hialuronano que contienen un excipiente estabilizante que es un catión divalente. Los ejemplos de cationes divalentes incluyen, pero sin limitación, lisil-lisina (dilisisina; Lys-Lys) o magnesio (por ejemplo, $MgCl_2$), o sales, derivados, análogos o miméticos de los mismos. En ejemplos particulares, las formulaciones estables de una enzima degradante de hialuronano contienen Lys-Lys, o sales, derivados, análogos o miméticos de los mismos, como excipiente estabilizante. En otros ejemplos, las formulaciones estables de una enzima degradante de hialuronano contienen $MgCl_2$, o derivados, análogos o miméticos de los mismos, como agente estabilizante. Las enzimas degradantes de hialuronano que contienen un catión divalente, por ejemplo, Lys-Lys o $MgCl_2$, son estables a temperaturas mayores o iguales a 37 °C durante al menos tres (3) días, y generalmente al menos seis días, 7 días (una semana), dos semanas, tres semanas o cuatro semanas (un mes). Por ejemplo, dichas formulaciones son estables a temperaturas mayores o iguales a de 37 °C a 42 °C, tales como al menos o aproximadamente o próximas a 40 °C, durante al menos un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses o más.

Las formulaciones existentes de enzimas degradantes de hialuronano contienen albúmina de suero humana (HSA) como estabilizante. Por ejemplo, Hylenex® recombinante contiene 1,0 mg de albúmina humana. Las formulaciones de enzima degradante de hialuronano sin HSA se desean por varios motivos. En primer lugar, la HSA es un producto derivado de la sangre, y por lo tanto a menudo no es pura. Los degradantes y contaminantes de la HSA pueden interferir con la actividad de la enzima. Además, la HSA en sí también está sometida a problemas de estabilidad, ya que puede formar agregados en determinadas condiciones. En el presente documento se observa que las formulaciones sin HSA estables de una enzima degradante de hialuronano, por ejemplo, una hialuronidasa, tal como una PH20, pueden producirse mediante la inclusión de un catión divalente, por ejemplo, Lys-Lys.

Asimismo, tal como se discute en otras partes del presente documento, la mayoría de las formulaciones existentes de una enzima degradante de hialuronano, por ejemplo, una hialuronidasa, tal como PH20, también contienen NaCl como agente estabilizante. La presencia de NaCl en altas cantidades de entre o aproximadamente entre 130 mM a 150 mM de NaCl o mayores se necesita generalmente para una actividad y estabilidad óptimas de la enzima. Por ejemplo, la formulación comercial de PH20 Hylenex® contiene 145 mM de NaCl. Tal como se demuestra en los ejemplos en el presente documento, el catión divalente Lys-Lys y el $MgCl_2$ muestran efectos de estabilidad en la enzima degradante de hialuronano ejemplar PH20 que está mejorada frente a NaCl. Esto es ventajoso, ya que en el presente documento se observa que el NaCl no estabiliza eficazmente a PH20 tras la incubación a temperaturas elevadas o aceleradas de más de 37 °C (véanse, por ejemplo, los ejemplos 23 y 24). Por el contrario, la actividad de PH20 en formulaciones que contienen cationes divalentes, tales como Lys-Lys, se retiene a temperaturas elevadas, de tal forma que las formulaciones pueden mostrar hasta un 70 % o más de actividad, y generalmente al menos o aproximadamente al menos un 80 %, 85 %, 90 %; o más actividad, después de incubación durante 4 semanas a temperaturas mayores o iguales a 37 °C, tales como mayores o iguales a 37 °C a 42 °C, tales como al menos o aproximadamente o próximas a 40 °C, durante al menos un mes. En los ejemplos de formulaciones en el presente

documento que contienen un catión divalente como estabilizante, por ejemplo, Lys-Lys, la actividad de la enzima degradante de hialuronano a temperaturas elevadas de al menos o aproximadamente al menos 38 °C a 42 °C, y en particular a 40 °C, aumenta en más de o en al menos un 10 %, 20 %; 30 %; 40 %; 50 %; 60 %; 70 %; 80 %; 90 % o más en comparación con la actividad de una enzima degradante de hialuronano que no contiene el catión divalente (por ejemplo contiene NaCl como agente estabilizante).

En el presente documento se proporcionan formulaciones de enzima degradante de hialuronano que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) y una cantidad de un catión divalente, tal como Lys-Lys o MgCl₂, para hacer que la formulación sea estable a temperaturas mayores o iguales a 37 °C durante al menos un mes. En ejemplos particulares, en el presente documento se proporcionan formulaciones de enzima degradante de hialuronano que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, tales como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) y una cantidad de Lys-Lys para hacer que la formulación sea estable a temperaturas mayores que o iguales a 37 °C durante al menos un mes. Por ejemplo, dichas formulaciones son estables a temperaturas mayores o iguales a de 37 °C a 42 °C, tales como al menos o aproximadamente o próximas a 40 °C, durante al menos un mes. Las formulaciones también contienen generalmente un tensioactivo, un agente antioxidante (por ejemplo, metionina), un pH de entre o aproximadamente entre 6,5 a 7,8 y un agente tamponador que mantiene el intervalo de pH. De manera opcional, las formulaciones pueden contener otros uno o más agentes estabilizantes, modificadores de la tonicidad, conservantes o excipientes.

Típicamente, los compuestos se formulan en composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta edición, 1985, 126). Las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan en previsión de su aprobación por una agencia reguladora u otra agencia, preparadas de acuerdo con farmacopeas generalmente reconocidas para su uso en animales y seres humanos. La formulación debe ajustarse al modo de administración.

Las formulaciones estables pueden proporcionarse como una preparación farmacéutica en forma líquida como soluciones, jarabes o suspensiones. En forma líquida, las preparaciones farmacéuticas pueden proporcionarse en forma de una preparación concentrada para diluirse en una concentración terapéuticamente eficaz antes de su uso. En general, las preparaciones se proporcionan en una forma de dosificación que no necesita dilución para su uso, es decir, formulaciones para administración directa. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). En otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden presentarse en forma liofilizada para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Las formulaciones pueden prepararse en forma de formulaciones monodosis o multidosis.

El volumen de las formulaciones proporcionadas en el presente documento puede ser cualquier volumen adecuado para el envase en el que se proporcionan. En algunos ejemplos, las formulaciones se proporcionan en un vial, jeringa, o cualquier otro envase adecuado. Por ejemplo, las formulaciones estables proporcionadas en el presente documento son de entre o entre aproximadamente 0,1 ml a 500 ml, tales como 0,1 ml a 100 ml, 1 ml a 100 ml, 0,1 ml a 50 ml, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente o 0,1 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml o más.

A continuación se proporciona una descripción de los componentes que se proporcionan en las formulaciones de enzima degradante de hialuronano en el presente documento. Las siguientes formulaciones estables son solo ejemplares y proporcionan una plataforma a partir de la cual pueden efectuarse ajustes menores. Se entiende que pueden efectuarse cambios muy pequeños en las concentraciones de los diversos excipientes y otros componentes (por ejemplo, ± 15 % de las concentraciones indicadas), o pequeños cambios en el pH, a la vez que se retienen una parte si no la totalidad de la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano. También pueden efectuarse cambios adicionales añadiendo o eliminando excipientes. Por ejemplo, puede cambiarse el tipo de tensioactivo estabilizante.

1. Enzima degradante de hialuronano

La cantidad de enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), en las formulaciones estables proporcionadas en el presente documento es una cantidad para administración directa suficiente para lograr un efecto terapéutico. En un ejemplo, la cantidad es una cantidad para administración directa suficiente para degradar el ácido hialurónico (HA) en el espacio subcutáneo por debajo de la superficie externa de la piel humana. Por ejemplo, la cantidad de enzima degradante de hialuronano en la formulación es una cantidad para administración directa para aumentar la dispersión y absorción de un agente terapéutico coinyectado o coadministrado. En otro ejemplo, la cantidad es una cantidad para administración directa suficiente para degradar el ácido hialurónico que se asocia con un tejido o célula enferma. Por ejemplo, la cantidad es una cantidad para administración directa suficiente para degradar el HA asociado con células tumorales. En

dichos ejemplos, la cantidad es una cantidad para reducir o disminuir la presión de fluido intersticial (IFP) o aumentar el volumen vascular tumoral.

Por ejemplo, la cantidad es funcionalmente equivalente a al menos o aproximadamente al menos 30 Unidades/ml.

5 Por ejemplo, las formulaciones proporcionadas en el presente documento contienen una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) en una cantidad de entre o aproximadamente entre 30 Unidades/ml a 20.000 U/ml, 300 U/ml a 15.000 U/ml, 300 U/ml a 10.000 U/ml, 300 U/ml a 5.000 U/ml, 300 U/ml a 3000 U/ml, 300 U/ml a 2000 U/ml, 600 U/ml a 20.000 U/ml, 600 U/ml a 15.000 U/ml, 600 U/ml a 10.000 U/ml, 600 U/ml a 6000 U/ml, 600 U/ml a 4000 U/ml, 600 U/ml a 2000 U/ml, 600 U/ml a 1000 U/ml, 60 U/ml a 100 U/ml, 100 U/ml a 300 U/ml, tal como al menos o aproximadamente al menos 30 U/ml, 35 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 700 U/ml, 800 U/ml, 900 U/ml, 1000 U/ml, 2000 U/ml, 3000 U/ml, 4000 U/ml, 5000 U/ml, 6000 U/ml, 7000 U/ml, 8000 U/ml, 9000 U/ml, 10.000 U/ml, 12.000 U/ml, 15.000 U/ml o 20.000 U/ml. Por ejemplo, las formulaciones proporcionadas en el presente documento contienen una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) que está en una cantidad que es al menos de 100 U/ml a 300 U/ml, por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente de 100 U/ml, 115 U/ml, 120 U/ml, 125 U/ml, 130 U/ml, 135 U/ml, 140 U/ml, 145 U/ml, 150 U/ml, 155 U/ml, 160 U/ml, 165 U/ml, 170 U/ml, 175 U/ml, 180 U/ml, 185 U/ml, 190 U/ml, 200 U/ml, 220 U/ml, 240 U/ml, 260 U/ml, 280 U/ml o 300 U/ml.

20 En las formulaciones estables proporcionadas en el presente documento, la estabilidad de una enzima degradante de hialuronano, incluyendo una hialuronidasa, tal como una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), en las formulaciones es una función de la recuperación y/o actividad de la enzima a temperaturas elevadas mayores a o iguales a 37 °C a 42 °C, tales como al menos de o aproximadamente de o próximas a 37 °C a 40 °C, durante al menos tres (3) días, y generalmente al menos un mes, tal como se describe anteriormente. Los ensayos para evaluar estos parámetros se describen en el presente documento. Las formulaciones proporcionadas en el presente documento retienen recuperación y/o actividad de hialuronidasa de tal forma que las formulaciones son adecuadas para uso terapéutico tal como se describe en el presente documento. En las formulaciones estables proporcionadas en el presente documento, la actividad de la enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20, es típicamente mayor de o de aproximadamente el 50 %, tal como mayor de o al menos el 55 %, 60 %; 65 %; 70 %; 80 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o más de la actividad inicial de la enzima en la formulación antes de la exposición a temperaturas mayores de o iguales a 37 °C a 42 °C durante al menos tres (3) días, y generalmente al menos un mes, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la actividad de la enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20, es típicamente mayor de o de aproximadamente el 50 %, tal como mayor de o al menos el 55 %, 60 %; 65 %; 70 %; 80 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % de la actividad de la misma formulación de enzima cuando se almacena a 4 °C durante al menos un mes. Típicamente, las formulaciones de enzima degradante de hialuronano proporcionadas en el presente documento muestran al menos un 70 % de la actividad inicial de la enzima durante al menos un mes de almacenamiento o uso a temperaturas mayores o iguales de 37 °C a 42 °C, tales como al menos de o aproximadamente de o próximas a 37 °C a 40 °C. Por lo tanto, por ejemplo, en una solución formulada con 600 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, por ejemplo, rHuPH20, al menos o aproximadamente al menos 360 Unidades/ml, 365 U/ml, 370 U/ml, 375 U/ml, 380 U/ml, 390 U/ml, 420 U/ml, 480 U/ml, 540 U/ml, 546 U/ml, 552 U/ml, 558 U/ml, 564 U/ml, 570 U/ml, 576 U/ml, 582 U/ml, 588 U/ml, 594 U/ml o más actividad se retiene a temperaturas mayores o iguales a 37 °C a 42 °C, tales como al menos de o aproximadamente de o próximas a 37 °C a 40 °C, durante al menos un mes. En otros ejemplos, la estabilidad puede evaluarse como una función de la recuperación de la enzima, por ejemplo, usando RP-HPLC. En dichos ejemplos, en las formulaciones proporcionadas en el presente documento la recuperación de la enzima hialuronidasa es desde entre o aproximadamente entre el 60 % al 140 %. Por ejemplo, en las formulaciones proporcionadas en el presente documento la recuperación de la enzima hialuronidasa es desde entre o aproximadamente entre 3-7 mg/ml.

2. Cation divalente

50 Las formulaciones estables de enzima degradante de hialuronano proporcionadas en el presente documento contienen una cantidad de un catión divalente para lograr al menos el 50 %, y generalmente al menos un 70 %, de la actividad enzimática inicial de la enzima degradante de hialuronano a temperaturas de entre o aproximadamente entre 37 °C a 42 °C, tales como al menos o aproximadamente 37 °C o 40 °C, durante al menos tres(3) días y generalmente al menos un mes (por ejemplo, 4 semanas) tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la cantidad de un catión divalente es una cantidad para lograr al menos un 75 %, 80 %; 85 %; 86 %; 87 %; 88 %; 89 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o más de la actividad enzimática inicial de la enzima degradante de hialuronano durante al menos tres (3) días, y generalmente durante al menos 4 semanas a temperaturas de entre o aproximadamente de entre 37 °C a 42 °C, tales como al menos o aproximadamente 40 °C.

65 Por ejemplo, las formulaciones degradantes de hialuronano proporcionadas en el presente documento pueden contener una cantidad de Lys-Lys, sal, derivado, análogo o mimético del mismo, para lograr al menos un 50 %, y generalmente al menos un 70 %, de la actividad enzimática inicial de la enzima degradante de hialuronano a temperaturas entre o aproximadamente entre 37 °C a 42 °C, tales como al menos o aproximadamente 40 °C, durante al menos tres (3) días y generalmente durante al menos 4 semanas. Dicha formulación estable de enzima

degradante de hialuronano (por ejemplo, una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20) proporcionada en el presente documento contiene entre o aproximadamente entre 5 mM a 300 mM de Lys-Lys, tal como de 10 mM a 200 mM, 50 mM a 150 mM o 10 mM a 50 mM. Por ejemplo, la formulación estable de enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20) proporcionada en el presente documento contiene al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM o más de Lys-Lys.

En otro ejemplo, las formulaciones degradantes de hialuronano proporcionadas en el presente documento pueden contener una cantidad de $MgCl_2$, derivado, análogo o mimético del mismo, para lograr al menos un 50 %, y generalmente al menos un 70 %, de la actividad enzimática inicial de la enzima degradante de hialuronano a temperaturas entre o aproximadamente entre 37 °C a 42 °C, tales como al menos o aproximadamente 40 °C, durante al menos tres (3) días y generalmente durante al menos 4 semanas. Dicha formulación estable de enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20) proporcionada en el presente documento contiene entre o aproximadamente entre 5 mM a 300 mM de $MgCl_2$, tal como de 10 mM a 200 mM, 50 mM a 150 mM o 10 mM a 50 mM. Por ejemplo, la formulación estable de enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20) proporcionada en el presente documento contiene al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM o más de $MgCl_2$.

Tal como se discute más adelante, las formulaciones que contienen un catión divalente (por ejemplo, Lys-Lys), en caso necesario, pueden contener también un modificador de la tonicidad (por ejemplo, NaCl).

3. pH y tampón

En el presente documento se proporcionan formulaciones estables de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) que tienen un pH de entre o de aproximadamente entre 6,5 a 7,8 o de 6,8 a 7,8, tal como entre o aproximadamente entre 6,5 a 7,5 o de 7,0 a 7,6. La referencia a pH en el presente documento se basa en la medición de pH a temperatura ambiente. Se entiende que el pH puede cambiar durante el almacenamiento con el paso del tiempo, pero permanecerá típicamente a entre o entre aproximadamente pH 6,5 a 7,8, por ejemplo, entre o aproximadamente entre 6,8 o a aproximadamente 7,8. Por ejemplo, el pH puede variar en $\pm 0,1$, $0,2$, $0,3$, $0,4$, $0,5$, $0,6$, $0,7$, $0,8$, $0,9$, $1,0$, $1,2$, $1,3$, $1,4$, $1,5$ o más. Por lo tanto, se entiende que la referencia a una formulación que tiene un pH de aproximadamente o al menos pH 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,6 incluye coformulaciones que tienen un pH de o de aproximadamente o de al menos $6,5 \pm 0,2$, $6,6 \pm 0,2$, $6,7 \pm 0,2$, $6,8 \pm 0,2$, $6,9 \pm 0,2$, $7,0 \pm 0,2$, $7,1 \pm 0,2$, $7,2 \pm 0,2$, $7,3 \pm 0,2$, $7,4 \pm 0,2$, $7,5 \pm 0,2$ o $7,6 \pm 0,2$ cuando se preparan.

En caso necesario, el pH puede ajustarse usando agentes acidificantes para disminuir el pH o agentes alcalinizantes para aumentar el pH. Los agentes acidificantes ejemplares incluyen, pero sin limitación, ácido acético, ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, solución de fosfato de sodio monobásico, y ácido fosfórico. Los agentes alcalinizantes incluyen, pero sin limitación, solución de fosfato de sodio dibásico, carbonato de sodio, o hidróxido de sodio.

Puede usarse cualquier tampón en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento en tanto que no afecten adversamente a la estabilidad de la formulación, y soporten el intervalo de pH necesario. Los ejemplos de tampones particularmente adecuados incluyen tampones Tris, succinato, acetato, fosfato, histidina, citrato, aconitato, malato y carbonato. Los expertos en la materia, sin embargo, reconocerán que las formulaciones proporcionadas en el presente documento no están limitadas a un tampón particular, en la medida en la que el tampón proporcione un grado aceptable de estabilidad de pH, o de "capacidad tamponadora" en el intervalo indicado. En general, un tampón tiene una capacidad tamponadora adecuada dentro de aproximadamente 1 unidad de pH de su pK (Lachman et al. 1986). La idoneidad del tampón puede estimarse basándose en tabulaciones de pK publicadas o puede determinarse empíricamente mediante métodos bien conocidos en la técnica. El pH de la solución puede ajustarse al punto deseado dentro del intervalo tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, usando cualquier ácido o base aceptable.

Los tampones que pueden incluirse en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, tampones Tris (trometamina), histidina, fosfato, tales como fosfato de sodio dibásico, y tampones citrato. Por ejemplo, el tampón puede ser un tampón de clorhidrato de histidina (histidina/HCl). En general, el agente tamponador está presente en una cantidad para mantener el intervalo de pH de la formulación entre o aproximadamente entre 6,5 a 7,8, por ejemplo, entre o aproximadamente entre 6,8 a 7,8 tal como entre o aproximadamente 7,0 a 7,6. Dichos agentes tamponadores pueden estar presentes en las formulaciones a concentraciones de entre o aproximadamente entre 1 mM a 100 mM, tales como 10 mM a 50 mM o 20 mM a 40 mM, tales como de o de aproximadamente 30 mM. Por ejemplo, dichos agentes tamponadores pueden estar presentes en las coformulaciones a una concentración de o de aproximadamente o de al menos 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, o más.

En algunos ejemplos, no es necesario un agente tamponador.

4. Tensioactivo

5 Las formulaciones estables proporcionadas en el presente documento contienen uno o más tensioactivos. Dichos tensioactivos inhiben la agregación de la enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) y minimizar la pérdida de absorción. Los tensioactivos son generalmente tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos que pueden incluirse en las formulaciones en el presente documento incluyen, pero sin limitación, ésteres parciales y de ácidos grasos y éteres de alcoholes polihídricos, tales como de glicerol, o sorbitol, poloxámeros y polisorbatos. Por ejemplo, los tensioactivos ejemplares en las formulaciones en el presente documento incluyen uno cualquiera o más de poloxamer 188 (PLURONICS®, tal como PLURONIC® F68), TETRONICS®, polisorbato 20, polisorbato 80, PEG 400, PEG 3000, Tween® (por ejemplo, Tween® 20 o Tween® 80), Triton® X-100, SPAN®, MYRJ®, BRIJ®, CREMOPHOR®, propilenglicoles o polietilenglicoles. En algunos ejemplos, las formulaciones en el presente documento contienen poloxamer 188, polisorbato 20, polisorbato 80, generalmente poloxamer 188 (pluronic F68). Las formulaciones proporcionadas en el presente documento contienen generalmente al menos un tensioactivo, tal como 1, 2 o 3 tensioactivos.

En las formulaciones proporcionadas en el presente documento, la cantidad total de los uno o más tensioactivos como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) en la formulación puede ser, por ejemplo, de entre o de entre aproximadamente del 0,0005 % al 1,0 %, tal como de entre o aproximadamente entre el 0,0005 % al 0,005 %, del 0,001 % al 0,01 %, del 0,01 % al 0,5 %, del 0,01 % al 0,1 % o del 0,01 % al 0,02 %. En general, las formulaciones contienen al menos un 0,01 % de tensioactivo y contiene menos de aproximadamente el 1,0 %, tal como menos del 0,5 % o menos del 0,1 % de tensioactivo. Por ejemplo, las formulaciones proporcionadas en el presente documento pueden contener un o aproximadamente un 0,001 %, 0,005 %; 0,01 %; 0,015 %; 0,02 %; 0,025 %; 0,03 %; 0,035 %; 0,04 %; 0,045 %; 0,05 %; 0,055 %; 0,06 %; 0,065 %; 0,07 %; 0,08 %; o 0,09 % de tensioactivo. En ejemplos particulares, las formulaciones proporcionadas en el presente documento contienen o contienen aproximadamente un 0,01 % a un o aproximadamente un 0,05 % de tensioactivo.

En el presente documento se observa que la oxidación de la enzima aumenta con niveles crecientes de tensioactivo. Asimismo, el tensioactivo poloxamer 188 provoca menos oxidación que los polisorbatos. De este modo, las formulaciones en el presente documento contienen generalmente poloxamer 188. Por lo tanto, aunque los tensioactivos son capaces de estabilizar una enzima degradante de hialuronano, la inclusión de tensioactivos en las formulaciones proporcionadas en el presente documento puede dar como resultado la oxidación de la enzima degradante de hialuronano a altas concentraciones. Por lo tanto, generalmente se usan concentraciones menores de tensioactivo en las coformulaciones del presente documento, por ejemplo, como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de menos del 1,0 % y generalmente de entre o aproximadamente entre el 0,01 % o el 0,05 %, tal como del 0,01 %. Asimismo, tal como se proporciona más adelante del presente documento, puede incluirse opcionalmente un agente antioxidante en la formulación para reducir o prevenir la oxidación.

5. Agente antioxidante

Las formulaciones proporcionadas en el presente documento pueden contener también antioxidantes para reducir o prevenir la oxidación, en particular, oxidación de la enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, los ejemplos en el presente documento muestran que la oxidación puede efectuarse mediante altas concentraciones de tensioactivo. Los antioxidantes ejemplares incluyen, pero sin limitación, cisteína, triptófano y metionina. En ejemplos particulares, el antioxidante es metionina. Las formulaciones proporcionadas en el presente documento pueden incluir un antioxidante a una concentración desde entre o desde aproximadamente entre 5 mM a o aproximadamente a 50 mM, tal como de 5 mM a 40 mM, 5 mM a 20 mM o 10 mM a 20 mM. Por ejemplo, puede proporcionarse metionina en las formulaciones en el presente documento a una concentración de entre o desde aproximadamente entre 5 mM a o a aproximadamente 50 mM, tal como de 5 mM a 40 mM, 5 mM a 20 mM o 10 mM a 20 mM. Por ejemplo, un antioxidante, por ejemplo metionina, puede incluirse a una concentración que es o es de aproximadamente o es de al menos 5 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM. En algunos ejemplos, las coformulaciones contienen 10 mM a 20 mM de metionina, tales como de o de aproximadamente o de al menos 10 mM a 20 mM de metionina.

6. Modificador de la tonicidad

Opcionalmente, las formulaciones de enzima degradante de hialuronano proporcionadas en el presente documento pueden contener un modificador de la tonicidad. En particular, es necesario un modificador de la tonicidad en las formulaciones que contienen concentraciones menores de un catión divalente, tal como Lys-Lys, ya que no se logra una tonicidad suficiente.

Por ejemplo, se incluye un modificador de la tonicidad en las formulaciones del presente documento para producir una solución con la osmolaridad deseada. Las formulaciones proporcionadas en el presente documento tienen una osmolaridad de entre o de aproximadamente entre 245 mOsm/kg a 500 mOsm/kg. Por ejemplo, la osmolaridad es de

o de aproximadamente o de al menos 245 mOsm/kg, 250 mOsm/kg, 255 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 265 mOsm/kg, 270 mOsm/kg, 275 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 285 mOsm/kg, 290 mOsm/kg, 295 mOsm/kg, 300 mOsm/kg, 350 mOsm/kg, 400 mOsm/kg, 450 mOsm/kg o 500 mOsm/kg. Típicamente, se incluye un modificador de la tonicidad en las formulaciones en el presente documento que contienen un catión divalente, tal como Lys-Lys, en una concentración que es menor de 100 mM, tal como menos de 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM o menos. Por ejemplo, se incluye un modificador de la tonicidad en las formulaciones en el presente documento que contienen un catión divalente, tales como Lys-Lys, a una concentración de entre o de aproximadamente entre 10 mM a 50 mM, tal como de aproximadamente 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM.

Los modificadores de la tonicidad incluyen, pero sin limitación, glicerina, NaCl, aminoácidos, polialcoholes, trehalosa, y otras sales y/o azúcares. Por ejemplo, las formulaciones proporcionadas en el presente documento pueden incluir opcionalmente NaCl como modificador de la tonicidad. El NaCl puede incluirse a una concentración de entre o de aproximadamente entre 0 mM a 200 mM, tal como generalmente de 30 mM a 100 mM, 50 mM a 160 mM, por ejemplo, de 50 mM a 120 mM o de 80 mM a 140 mM. En general, el NaCl es menor de 150 mM, y generalmente menor de 140 mM, 130 mM, 120 mM, 110 mM, 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM o menos. La cantidad particular es una función de la concentración de catión divalente, por ejemplo, Lys-Lys. Por ejemplo, cuanto mayor sea la concentración de Lys-Lys, menor será la concentración de NaCl (o sin NaCl). La cantidad particular puede determinarse empíricamente para retener la actividad enzimática y/o la tonicidad.

En otro ejemplo, se incluye opcionalmente glicerina (glicerol) en las formulaciones estables. Por ejemplo, las formulaciones proporcionadas en el presente documento contienen típicamente menos de 60 mM de glicerina, tal como menos de 55 mM, menos de 50 mM, menos de 45 mM, menos de 40 mM, menos de 35 mM, menos de 30 mM, menos de 25 mM, menos de 20 mM, menos de 15 mM, 10 mM o menos. La cantidad de glicerina depende típicamente de la cantidad de catión divalente (por ejemplo, Lys-Lys) presente: cuanto más catión divalente (por ejemplo, Lys-Lys) esté presente en la formulación, se necesitará menos glicerina para lograr la osmolaridad deseada. Por lo tanto, en algunos casos, se necesita incluir poca o nada de glicerina en la formulación.

7. Otros agentes o excipientes

Las formulaciones estables proporcionadas en el presente documento pueden contener opcionalmente otros uno o más agentes, vehículos, excipientes o conservantes. Por ejemplo, los estabilizantes ejemplares que puede incluirse opcionalmente en las formulaciones de enzima degradante de hialuronano proporcionadas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, aminoácidos, derivados de aminoácidos, aminas, azúcares, polioles, sales y tampones, tensioactivos, y otros agentes. Por ejemplo, entre los tipos de estabilizantes que pueden contenerse opcionalmente en las formulaciones del presente documento se incluye un estabilizante de aminoácido o un inhibidor de hialuronidasa (por ejemplo, un sustrato de hialuronidasa, tal como hialuronidasa). Los estabilizantes de aminoácidos ejemplares, derivados de aminoácidos o aminas incluyen, pero sin limitación, L-Arginina, Glutamina, glicina, Lisina, Metionina, Prolina, Lys-Lys, Gly-Gly, óxido de trimetilamina (TMAO) o betaína. Los ejemplos de azúcares y polioles incluyen, pero sin limitación, glicerol, sorbitol, manitol, inositol, sacarosa o trehalosa. Los ejemplos de sales y tampones incluyen, pero sin limitación, cloruro de magnesio, sulfato de sodio, Tris, tal como Tris (100 mM), o benzoato de sodio. Los tensioactivos ejemplares incluyen, pero sin limitación, poloxamer 188 (por ejemplo, Pluronic® F68), polisorbato 80 (PS80), polisorbato 20 (PS20). Otros estabilizantes incluyen, pero sin limitación, ácido hialurónico (HA), seroalbúmina humana (HSA), ácido fenil butírico, ácido taurocólico, polivinilpirrolidona (PVP) o cinc. En ejemplos particulares del presente documento, las enzimas degradantes de hialuronano estables no contienen HSA y son formulaciones sin HSA.

Para las formulaciones estables formuladas para administración multidosis, las formulaciones también pueden contener opcionalmente una cantidad de conservantes que, cuando se combina con los componentes expuestos anteriormente, dan como resultado una formulación estable. Cuando se incluyen, los conservantes están presentes a una concentración suficiente para proporcionar los requisitos antimicrobianos de, por ejemplo, la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y de la Farmacopea Europea (EP). La tabla 23, en el ejemplo 7E más adelante, expone estos requisitos, incluyendo los requisitos antimicrobianos EP mínimos (EPA) y los requisitos antimicrobianos EP preferidos (EPB). Típicamente, las formulaciones que cumplen con los requisitos antimicrobianos EP (EPA o EPB) contienen más conservante que aquellas formuladas solo para cumplir con los requisitos antimicrobianos USP. En general, cuando se incluyen, las formulaciones proporcionadas en el presente documento contienen conservantes en una cantidad que muestra actividad antimicrobiana eliminando o inhibiendo la propagación de organismos microbianos en una muestra de la composición según se evalúa en una prueba de eficacia conservante antimicrobiana (APET) tal como se discute en otras partes en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de conservantes que pueden incluirse en las formulaciones proporcionadas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, fenol, meta-cresol (m-cresol), el metilparabeno, alcohol bencílico, timerosal, cloruro de benzalconio, 4-cloro-1-butanol, diclorhidrato de clorhexidina, digluconato de clorhexidina, L-fenilalanina, EDTA, bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), acetato fenilmercúrico, glicerol (glicerina), imidourea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, orto-cresol (o-cresol), para-cresol (p-cresol), clorocresol, cetrimida, cloruro de bencetonio, etilparabeno, propilparabeno o butilparabeno y cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, el conservante en la

formulación contiene al menos un conservante fenólico. Por ejemplo, la formulación contiene fenol, m-cresol o fenol y m-cresol. Cuando se incluyen en las formulaciones proporcionadas en el presente documento, la cantidad total de los uno o más agentes conservantes como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) en la formulación puede ser, por ejemplo, de entre o de entre aproximadamente del 0,1 % al 0,4 %, tal como del 0,1 % al 0,3 %, del 0,15 % al 0,325 %, del 0,15 % al 0,25 %, del 0,1 % al 0,2 %, del 0,2 % al 0,3 %, o del 0,3 % al 0,4 %, y generalmente menos del 0,4 % (p/v) de conservante, por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos un 0,1 %, 0,12 %, 0,125 %, 0,13 %, 0,14 %, 0,15 %, 0,16 %, 0,17 %, 0,175 %, 0,18 %, 0,19 %, 0,2 %, 0,25 %, 0,3 %, 0,325 %, 0,35 % pero menos de un 0,4 % en total de conservante.

Opcionalmente, las formulaciones pueden incluir vehículos, tales como un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la formulación. Los ejemplos adecuados de vehículos farmacéuticos se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada o en forma parcialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para su administración adecuada al paciente. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos cuyo origen es petróleo, animal, vegetal u origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, y aceite de sésamo. El agua es un vehículo típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables.

Por ejemplo, los vehículos farmacéuticamente aceptables usados 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 inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de dextrosa y Ringer lactado. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites no volátiles de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Pueden añadirse agentes antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a las preparaciones parenterales envasadas en envases multidosis, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres del 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 clorhidrato 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 vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste del pH.

Las composiciones pueden contener junto con un principio activo: un diluyente, tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; un aglutinante, tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábiga, gelatina, glucosa, melaza, polivinilpirrolidona, celulosas y derivados de las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes similares conocidos para los expertos en la materia.

Por ejemplo, puede añadirse un excipiente de proteína a la formulación que puede ser cualquiera de una serie de proteínas o péptidos farmacéuticamente aceptables. En general, el excipiente de proteínas se selecciona respecto de su capacidad para administrarse a un sujeto mamífero sin provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la albúmina de suero humana es generalmente adecuada para su uso en formulaciones farmacéuticas, aunque típicamente no se incluye en las formulaciones estables en el presente documento. Otros excipientes de proteínas farmacéuticas conocidos incluyen, pero sin limitación, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propileno, glicoles, agua, y etanol. El excipiente se incluye en la formulación a una concentración suficiente para prevenir la adsorción de la proteína al vaso o vial contenedor. La concentración del excipiente variará de acuerdo con la naturaleza del excipiente y de la concentración de la proteína en la coformulación.

Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de sodio de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros agentes similares.

8. Formulaciones de enzima degradante de hialuronano estables ejemplares

En el presente documento se proporcionan formulaciones de enzima degradante de hialuronano que son estables a temperaturas de 37 °C a 42 °C, tales como mayores o iguales a 37 °C o 40 °C, durante al menos tres (3) días, y generalmente al menos un mes.

En un ejemplo, una formulación ejemplar contiene: 100 U/ml a 1000 U/ml, tal como de 100 U/ml a 500 U/ml o de 100 U/ml a 300 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), y en particular al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 155 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20); de o de aproximadamente 5 mM a o a aproximadamente 200 mM, tal como de 10 mM a 50 mM o de 5 mM a 20 mM de Lys-Lys (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM); desde o desde aproximadamente 0 mM a o a aproximadamente 300 mM de fosfato de sodio dibásico (por ejemplo, desde o desde aproximadamente 0 mM a 150 mM o de 5 mM a 50 mM de fosfato de sodio dibásico, tal como al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM, 100 mM o 150 mM); de 0 mM a o a aproximadamente 50 mM de metionina (por ejemplo, entre o aproximadamente entre 5 mM a 20 mM, tal como al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM de metionina); y desde o desde aproximadamente un 0,01 % a o a aproximadamente un 0,5 % de poloxamer 188, tal como de un 0,01 % a un 0,05 % (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos un 0,01 %, 0,02 %; 0,03 %; 0,04 % o 0,05 % de polisorbato 80). Las formulaciones se preparan con un pH desde o desde aproximadamente 6,5 a 7,6, tal como desde o desde aproximadamente 6,5 a 7,2 o de 7,0 a o a aproximadamente 7,6 (por ejemplo, un pH de al menos o aproximadamente al menos 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6). En ejemplos adicionales, el NaCl se incluye a una concentración menor de 140 mM. Por ejemplo, se incluye NaCl a una concentración de o de aproximadamente 50 mM a 150 mM, tal como al menos o aproximadamente al menos 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM o 100 mM.

En otro ejemplo, una formulación ejemplar contiene: 100 U/ml a 1000 U/ml, tal como de 100 U/ml a 500 U/ml o de 100 U/ml a 300 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), y en particular al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 155 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20); de o de aproximadamente 5 mM a o a aproximadamente 200 mM, tal como de entre o aproximadamente de entre 50 mM a 150 mM de MgCl₂ (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM o 150 mM); desde o desde aproximadamente 0 mM a o a aproximadamente 300 mM de clorhidrato de histidina (por ejemplo, desde o desde aproximadamente 0 mM a 150 mM o de 5 mM a 50 mM de clorhidrato de histidina, tal como al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM, 100 mM o 150 mM); desde o desde aproximadamente 0 mM a o a aproximadamente 50 mM de metionina (por ejemplo, entre o aproximadamente entre 5 mM a 20 mM, tal como al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM de metionina); y desde o desde aproximadamente un 0,01 % a o a aproximadamente un 0,5 % de poloxamer 188, tal como de un 0,01 % a un 0,05 % (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos un 0,01 %, 0,02 %; 0,03 %; 0,04 % o 0,05 % de polisorbato 80). Las formulaciones se preparan con un pH desde o desde aproximadamente 6,5 a 7,6, tal como desde o desde aproximadamente 6,5 a 7,2 o de 7,0 a o a aproximadamente 7,6 (por ejemplo, un pH de al menos o aproximadamente al menos 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6).

E. POLIPÉPTIDOS DE INSULINA

En el presente documento se proporcionan coformulaciones de una enzima degradante de hialuronano y una insulina. Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen una insulina de acción rápida, tal como una insulina regular o un análogo de insulina (por ejemplo, denominado un análogo de insulina de acción rápida o un análogo de rápida acción, usados de manera intercambiable en el presente documento) que está modificado (por ejemplo, mediante reemplazo de aminoácidos) para reducir la autoasociación de la insulina y dar como resultado una disociación más rápida de los hexámeros.

La insulina es un polipéptido compuesto de 51 restos de aminoácidos que tiene un peso molecular de 5808 Dalton. Se produce en los islotes de células betas de Langerhans en el páncreas. Una insulina humana ejemplar se traduce como un polipéptido precursor de 110 aminoácidos, proinsulina (SEQ ID NO: 101), que contiene un péptido de secuencia de señal de 24 aminoácidos para el ER, la secuencia de señal se escinde, dando como resultado proinsulina (SEQ ID NO: 102). La molécula de proinsulina se convierte posteriormente en insulina madura mediante la acción de enzimas proteolíticas, conocidas como prohormona convertasas (PC1 y PC2) y por la acción de la exoproteasa carboxipeptidasa E. Esto da como resultado la eliminación de 4 restos de aminoácidos básicos y los restantes 31 aminoácidos de péptido C o de cadena conectora (correspondientes a los restos de aminoácido 57 a 87 del polipéptido de proinsulina expuesto en la SEQ ID NO: 101). La insulina resultante contiene una cadena A de 21 aminoácidos (correspondiente a los restos de aminoácido 66 a 86 del polipéptido de proinsulina expuesto en la SEQ ID NO: 102) y una cadena B de 30 aminoácidos (correspondiente a los restos de aminoácido 1 a 30 del polipéptido de proinsulina expuesto en la SEQ ID NO: 102), que se reticulan mediante enlaces disulfuro. Típicamente, la insulina madura contiene tres puentes disulfuro: uno entre la posición 7 de la cadena A y la posición 7 de la cadena B, un segundo entre la posición 20 de la cadena A y la posición 19 de la cadena B, y un tercero entre las posiciones 6 y 11 de la cadena A. La secuencia de la cadena A de la insulina madura se expone en la SEQ ID NO: 103 y la secuencia de la cadena B se expone en la SEQ ID NO: 104.

La referencia a la insulina incluye polipéptidos de proinsulina, proinsulina e insulina en formas monocatenarias o bicatenarias, formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y de especie,

variantes codificadas por variantes de corte y empalme y otras variantes, tales como análogos de insulina u otras formas derivatizadas, incluyendo polipéptidos que tienen al menos un 40 %, 45 %; 50 %; 55 %; 60 %; 65 %; 70 %; 75 %; 80 %; 85 %; 90 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o más identidad de secuencia con el polipéptido precursor expuesto en la SEQ ID NO: 101 o la forma madura del mismo, en tanto que la insulina se une al receptor de insulina humano para iniciar una cascada de señalización que da como resultado un aumento de la captación y almacenamiento de glucosa y/o una disminución de la producción de glucosa endógena. Por ejemplo, las insulinas incluyen variantes de especie de insulina. Estas incluyen, pero sin limitación, insulinas de procedencia bovina (expuesta en la SEQ ID NO: 133) y porcina (SEQ ID NO: 123). La insulina bovina difiere de la insulina humana en los aminoácidos 8 y 10 de la cadena A, y en el aminoácido 30 de la cadena B. La insulina porcina solo difiere de la insulina humana en el aminoácido 30 en la cadena B en donde, al igual que la secuencia bovina, hay una sustitución de alanina en lugar de treonina. Otras variantes de especie ejemplares de insulina se exponen en cualquiera de las SEQ ID NO: 105-146.

Entre las variantes de insulina se incluyen análogos de insulina que contienen una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con una insulina humana expuesta en las SEQ ID NO: 103 y 104 (cadenas A y B). Estas variantes incluyen análogos de insulina de acción rápida o de acción duradera (todas denominadas en el presente documento como análogo de insulina de acción rápida, aunque se entiende que para los fines del presente documento, esto incluye formas de análogos de insulina de acción rápida y de acción duradera). Los análogos de insulina ejemplares (cadenas A y B), incluyendo formas análogas de acción rápida y de acción duradera, se exponen en las SEQ ID NO: 147-165, 182-184. Por ejemplo, los análogos de insulina incluyen, pero sin limitación, glulisina (LysB3, GluB29; expuestas en las SEQ ID NO: 103 (cadena A) y SEQ ID NO: 149 (cadena B)), HMR-1 153 (LysB3, IleB28; expuestas en la SEQ ID NO: 103 (cadena A) y SEQ ID NO: 182 (cadena B)), HMR-1423 (GlyA21, HisB3 1, HisB32; expuestas en las SEQ ID NO: 183 (cadena A) y la SEQ ID NO: 184 (cadena B)), insulina aspart (AspB28; expuestas en las SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 147 (cadena B)), e insulina lispro (LysB28, ProB29; expuestas en las SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 148 (cadena B)). En cada uno de los casos anteriores, la nomenclatura de los análogos está basada en una descripción de la sustitución de aminoácidos en las posiciones específicas de la cadena A o B de insulina, numeradas desde el extremo N-terminal de la cadena, en la que el resto de la secuencia es la de la insulina humana natural.

Por lo tanto, la insulina regular, tal como se proporciona en las coformulaciones en el presente documento es una insulina madura que contiene una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 103 y 104. Un ejemplo de una insulina humana regular es la insulina humana recombinante denominada Humulin® R. Las insulinas regulares también incluyen variantes de especies de la insulina madura que tienen una cadena A y una B, por ejemplo, formas maduras de cualquiera de las SEQ ID NO: 105-146. Otros análogos de insulina ejemplares incluidos en las coformulaciones en el presente documento incluyen, pero sin limitación, una insulina que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 149 (cadena B); una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 147 (cadena B); o una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 148 (cadena B).

Cualquiera de los polipéptidos de insulina anteriores incluyen aquellos que se producen por el páncreas de cualquier especie, tal como un ser humano, y también incluyen insulinas que se producen sintéticamente o usando técnicas recombinantes. Por ejemplo, tal como se describe en otras partes del presente documento, la insulina puede producirse biosintéticamente expresando genes sintéticos para las cadenas A y B de la insulina, expresando la proinsulina completa y exponiéndola a los métodos enzimáticos y químicos adecuados para generar una insulina madura, o expresando cadenas A y B conectadas mediante un péptido enlazador (véase, por ejemplo, DeFelippis et al. (2002) *Insulin Chemistry and Pharmacokinetics*. En Ellenberg y Rifkin's *Diabetes Mellitus* (págs. 481-500) McGraw-Hill Professional).

Las insulinas también incluyen formas monoméricas y oligoméricas, tales como formas hexaméricas. La insulina puede existir en forma de un monómero ya que circula en el plasma, y también se une a su receptor mientras que está en una forma monomérica. La insulina, sin embargo, tiene propensión a autoasociarse en dímeros, y en presencia de iones metálicos, tales como Zn^{2+} puede asociarse fácilmente en estructuras de orden mayor, tales como hexámeros. Hay dos sitios de unión simétricos de alta afinidad para Zn^{2+} , aunque también se han comunicado otros sitios de unión a cinc más débiles (véase, por ejemplo, DeFelippis et al. (2002) *Insulin Chemistry and Pharmacokinetics*. En Ellenberg y Rifkin's *Diabetes Mellitus* (págs. 481-500) McGraw-Hill Professional). La auto-asociación es importante para la estabilidad de la molécula para prevenir la degradación química y la desnaturalización física. Por lo tanto, en las vesículas de almacenamiento en las células beta pancreáticas, la insulina existe en forma de hexámero. Tras la liberación al espacio extracelular, sin embargo, se cree que los hexámeros de insulina pueden experimentar un cambio en el pH a condiciones más neutras y se diluyen los hexámeros que contienen ión cinc, lo que desestabiliza al hexámero. Puede haber otras razones que contribuyen a la desestabilización del hexámero de insulina en el espacio extracelular. Por lo tanto, la insulina se encuentra predominantemente en la sangre en forma de monómero. Para aprovechar los efectos estabilizantes, la mayoría de las formulaciones comerciales de insulina contienen iones de cinc en cantidades suficientes para promover la auto-asociación en hexámeros. La estructura hexamérica, sin embargo, frena la velocidad de absorción de estas formulaciones tras su administración subcutánea.

La insulina se usa como agente terapéutico para el control glucémico, tal como en pacientes diabéticos. Hay varios tipos de formulaciones de insulina que existen, dependiendo de si la insulina se administra para controlar la glucosa para terapia basal, para terapia prandial, o para una combinación de los mismos. Las formulaciones de insulina pueden proporcionarse únicamente como formulaciones de acción rápida, únicamente como formulaciones de acción basal (es decir, formas de acción intermedia y/o de larga duración), o como mezclas de las mismas (véase, por ejemplo, la tabla 4). Típicamente, las mezclas contienen una insulina de acción rápida y una insulina de acción intermedia o de larga acción. Por ejemplo, las insulinas de acción rápida pueden combinarse con una insulina NPH (una insulina de acción intermedia ejemplar tal como se ha discutido anteriormente) en diversas proporciones de mezcla incluyendo 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, y 50:50. Dichas preparaciones premezcladas pueden reducir el número de inyecciones diarias de insulina proporcionando de manera conveniente los requisitos de insulina relacionados con la comida y basales en una sola formulación.

Las preparaciones de insulina incluyen un polipéptido de insulina o una variante (es decir, análogo) del mismo formulado de una manera específica. En algunos casos, los componentes y sustancias en la formulación son los que confieren diferentes propiedades a la insulina, tal como una duración de la acción diferente. Por ejemplo, la mayoría de preparaciones de insulina contienen un ión metálico, tal como cinc, en la formulación, lo que estabiliza a la insulina promoviendo la autoasociación de la molécula. La auto-asociación en formas hexaméricas puede afectar a la absorción de insulina tras su asociación. Además, algunas formulaciones de insulina basales de larga acción se preparan precipitando insulina a partir de un tampón acetato (en lugar de fosfato) mediante la adición de cinc. Los grandes cristales de insulina con alto contenido en cinc, cuando se recogen y se resuspenden en una solución de acetato de sodio-cloruro de sodio (pH 7,2 a 7,5), se absorben lentamente después de su inyección subcutánea y ejercen una acción de larga duración. Esta preparación en cristal se denomina suspensión de insulina cinc extendida (insulina ultralenta). Otras preparaciones de insulina que contienen cinc incluyen, por ejemplo, insulinas semilentas (suspensiones de insulina cinc rápidas) e insulinas lentas (suspensiones de insulina cinc), que difieren predominantemente en la concentración de cinc usada. Las preparaciones de insulina que contienen cinc también incluyen aquellas que se modifican mediante protamina, tal como NPH insulina.

En otro ejemplo, puede añadirse un agente precipitante, tal como protamina, a un polipéptido de insulina para generar una suspensión microcristalina. Típicamente, las insulinas cristalinas tienen una duración de acción prolongada en comparación con insulinas que no existen en forma cristalina. Una protamina cinc insulina, cuando se inyecta por vía subcutánea en una suspensión acuosa, se disuelve solo lentamente en el sitio de deposición, y la insulina se absorbe a una velocidad retardada. La suspensión de protamina cinc insulina reemplazado en gran medida por suspensión de isofano insulina, también conocida como insulina NPH. Es una suspensión de protamina cinc insulina modificada que es cristalina. Las concentraciones de insulina, protamina, y cinc se disponen de tal modo que la preparación tiene un inicio y una duración de la acción intermedia entre aquellas de la insulina regular y la suspensión de protamina cinc insulina.

Además, las diferencias de pH en las preparaciones también influyen al tipo y propiedad de la insulina. La mayoría de las insulinas se formulan a pH neutro. Una excepción es la insulina glargina, que se proporciona en forma de una formulación comercial a pH 4,0. Por obra de la adición de dos argininas al extremo C-terminal de la cadena B, se desplaza el punto isoeléctrico de la insulina glargina haciéndola más soluble a un pH ácido. Existe un cambio adicional de aminoácido en la cadena A (N21G) para prevenir la desamidación y dimerización, dando como resultado una asparagina sensible a ácido. La secuencia de la cadena A de la insulina glargina se expone en la SEQ ID NO: 150 y la cadena B se expone en la SEQ ID NO: 151. Ya que la exposición a pH fisiológico sucede tras su administración, se forman microprecipitados, que hacen que la glargina sea similar a una insulina cristalina de larga duración.

La tabla 4 a continuación resume varios tipos de insulina, su inicio de la acción y su aplicación.

TABLA 4: Tipos de insulinas					
Tipo	Nombre comercial	Inicio	Pico	Duración	Aplicación
Acción rápida: Análogos de insulina	Lispro (por ejemplo, Humalog®); Aspart (por ejemplo, NovoLog®); Glulisina	5-15 minutos	45-90 minutos	3-4 horas	Control de glucosa post-prandial
Acción rápida: Insulina regular	Insulina regular (por ejemplo, Humulin® R; Novolin® R; Velosulin® Humana)	30 minutos - 1 hora	2-5 horas	5-8 horas	Control de glucosa post-prandial
Acción intermedia	Lente® (por ejemplo, Humulin® L, Novolin® L); NPH (por ejemplo, Humulin® N, Novolin® N);	1-3 horas	6-12 horas	20-24 horas	Suplementación de insulina basal
Larga duración	Ultralenta (por ejemplo, Humulin® U); glargina; detemir (un análogo)	4-6 horas	18-28 horas	28 horas	Suplementación de insulina basal

TABLA 4: Tipos de insulinas

Tipo	Nombre comercial	Inicio	Pico	Duración	Aplicación
Mezclas	Humulin® 50/50; Humulin® 70/30; Novolin® 70/30; Humalog® Mix 75/25	Varía	Varía	Varía	

Las insulinas más comúnmente usadas son insulinas de acción rápida, que incluyen insulina regular (es decir, insulina nativa o de tipo silvestre, incluyendo variantes alélicas y de especies de las mismas) y análogos de insulina de acción rápida. Para los fines del presente documento, la referencia a insulina es una insulina de acción rápida, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Insulinas de acción rápida

Las insulinas de acción rápida que pueden usarse en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento de insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), incluyen insulina regular, que es insulina de tipo silvestre o nativa, y análogos de insulina de acción rápida. Por obra de su rápida velocidad de absorción en comparación con las insulinas de acción basal, las insulinas de acción rápida se usan predominantemente con fines de control postprandial. Las insulinas de acción rápida ejemplares se exponen en la tabla 5 a continuación. Las insulinas de acción rápida incluyen también cualquiera conocida en la técnica, tales como, pero sin limitación, cualquier preparación de insulina y dispositivos divulgados en la Patente de Estados Unidos n.º 7.279.457 y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos n.º 20070235365, 20080039368, 20080039365, 20070086952, 20070244467, y 20070191757. Puede combinarse cualquier insulina de acción rápida en coformulaciones con una enzima degradante de hialuronano proporcionada en el presente documento. Dicha formulación también puede incluir adicionalmente una mezcla de una insulina de acción rápida con una insulina intermedia o de larga acción, además de una enzima degradante de hialuronano.

TABLA 5. Insulinas de acción rápida

Nombre	Especie	Cadena A (SEQ ID NO)	Cadena B (SEQ ID NO)	Nombre comercial
Insulina regular	Humana	103	104	Humulin R®; Novolin® R; Velosulin®
Insulina regular	Porcina	88-108 de SEQ ID NO: 123	25-54 de SEQ ID NO: 123	Iletin II®;
Insulina Aspart	Análogo humano	103	147	Novolog®
Insulina Lispro	Análogo humano	103	148	Humalog®
Insulina Glulisina	Análogo humano	103	149	Apidra®

a. Insulina regular

Las insulinas regulares incluyen el polipéptido de insulina nativo o de tipo silvestre. Estos incluyen insulina humana, así como insulinas de bovino, porcino y otras especies. Las insulinas humanas regulares se comercializan como Humulin® R, Novolin® R y Velosulin®. La insulina porcina se comercializó como Iletin II®. En general, la insulina regular, cuando se administra sola por vía subcutánea, tiene un inicio de la acción de 30 minutos. Se observan niveles máximos en plasma a las 1-3 horas y la duración de la intensidad aumenta con la dosificación. La semivida en plasma después de la administración subcutánea es de aproximadamente 1,5 horas.

b. Análogos de acción rápida (también denominados insulinas de acción rápida)

Los análogos de insulina de acción rápida, que a menudo se denominan insulinas de acción rápida en la técnica, son formas modificadas de insulina que contienen típicamente uno o más cambios de aminoácidos. Los análogos están diseñados para reducir la auto-asociación de la molécula de insulina con el fin de aumentar la velocidad de absorción y de aparición de la acción en comparación con la insulina regular. En general, dichos análogos se formulan en presencia de cinc, y por lo tanto existen en forma de hexámeros de cinc estables. Debido a la modificación, sin embargo, tienen una disociación más rápida del estado hexamérico después de la administración subcutánea en comparación con la insulina regular.

i. Insulina Lispro

La insulina humana lispro es una formulación de polipéptido de insulina que contiene cambios de aminoácidos en las posiciones 28 y 29 de la cadena B, de tal forma que la Pro-Lys en esta posición en la cadena B de insulina de tipo

silvestre expuesta en la SEQ ID NO: 104 se invierte a Lys-Pro. La secuencia de insulina lispro se expone en las SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 148 (cadena B). Se comercializa con el nombre Humalog® (insulina lispro, de origen de ADNr). El resultado de la inversión de estos dos aminoácidos es un polipéptido con una propensión reducida para autoasociarse, lo que permite una aparición de la acción más rápida. Específicamente, la inversión de secuencia en la cadena B da como resultado la eliminación de dos interacciones hidrófobas y el debilitamiento de dos enlaces de hidrógeno de beta lámina plegada que estabilizan al dímero (véase, por ejemplo, DeFelippis et al. (2002) *Insulin Chemistry and Pharmacokinetics*. En Ellenberg y Rifkin's *Diabetes Mellitus* (págs. 481-500) McGraw-Hill Professional). El polipéptido se autoasocia y forma hexámeros como resultado de los excipientes proporcionados en la formulación, tales como agentes antimicrobianos (por ejemplo, m-cresol) y cinc para su estabilización. Sin embargo, debido a la modificación de aminoácidos, la insulina lispro actúa más rápidamente que la insulina regular.

ii. Insulina Aspart

La insulina aspart es una formulación de polipéptido de insulina que contiene una sustitución de aminoácidos en la posición 28 de la cadena B de insulina humana expuesta en la SEQ ID NO: 104 de una prolina a un ácido aspártico. La secuencia de insulina aspart se expone en la SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 147 (cadena B). Se comercializa con el nombre Novolog® (insulina aspart [de origen de ADNr] inyección). La modificación en la insulina aspart confiere un grupo carboxilo de cadena lateral cargado negativamente para crear repulsión de carga y desestabilizar la interacción monómero monómero. Además, la eliminación de la prolina elimina una interacción hidrófoba clave entre monómeros (véase, por ejemplo, DeFelippis et al. (2002) *Insulin Chemistry and Pharmacokinetics*. En Ellenberg y Rifkin's *Diabetes Mellitus* (págs. 481-500) McGraw-Hill Professional). El análogo existe en gran medida en forma de un monómero, y es menos propenso a agregarse en comparación con otros análogos de acción rápida, tales como lispro. En general, la insulina aspart y la insulina lispro son similares en sus respectivas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.

iii. Insulina Glulisina

La insulina glulisina humana es una formulación de polipéptido de insulina que contiene una sustitución de aminoácidos en la cadena B en las posiciones B3 de asparagina a lisina y en el aminoácido B29 de lisina a ácido glutámico, en comparación con la secuencia de la cadena B de insulina humana expuesta en la SEQ ID NO: 104. La secuencia de insulina glulisina se expone en la SEQ ID NO: 103 (cadena A) y la SEQ ID NO: 149 (cadena B). Se comercializa con el nombre Apidra® (insulina glulisina [de origen de ADNr] inyección). Las moléculas hacen que la molécula de polipéptido sea menos propensa a la auto-asociación en comparación con la insulina humana. A diferencia de otros análogos de insulina, el polipéptido se formula comercialmente en ausencia del cinc promotor de hexámero (Becker et al. (2008) *Clinical Pharmacokinetics*, 47:7-20). De este modo, la insulina glulisina tiene una velocidad más rápida de inicio que la insulina lispro y la insulina aspart.

F. COFORMULACIONES ESTABLES DE INSULINA Y ENZIMA DEGRADANTE DE HIALURONANO

En el presente documento se proporcionan coformulaciones estables de insulina, en particular insulinas de acción rápidas incluyendo insulina regular y análogos de insulina de acción rápida (también denominados análogos de insulina de rápida acción), y enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas solubles (por ejemplo, rHuPH20). Los ejemplos de las formulaciones proporcionadas en el presente documento son coformulaciones estables de un análogo de insulina de acción rápida y una PH20 o un fragmento de la misma truncado en C-terminal que es soluble y activo (por ejemplo, rHuPH20). Las composiciones proporcionadas que contienen una enzima degradante de hialuronano y una insulina de acción rápida se formulan para su estabilidad a varias temperaturas o en varias condiciones. Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento son estables a desde o aproximadamente desde 0 °C a 40 °C o en varias condiciones de estrés (por ejemplo, agitación) durante varias horas, días, semanas, meses o años, tal como se describe en el presente documento. De este modo, las formulaciones son adecuadas para uso multidosis o son adecuadas para otras condiciones de uso que requieren temperaturas elevadas o agitación. Por ejemplo, las coformulaciones son adecuadas para formulaciones multidosis inyectables (MDI) así como para formulaciones de infusión subcutánea continua (CSI). Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento se formulan para su administración por inyección subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, y rutas transdérmicas. Las formulaciones ejemplares se formulan para administración subcutánea.

Las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento son formulaciones multidosis. De este modo, todas las formulaciones proporcionadas en el presente documento contienen una insulina (por ejemplo, una insulina de acción rápida, tal como un análogo de insulina de acción rápida), una enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, una PH20), un conservante, y otros uno o más excipientes estabilizantes.

Tal como se describe en el presente documento y como se ilustra en los ejemplos, se observa que debido a los requisitos opuestos de estabilidad de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), y de una insulina de acción rápida, las coformulaciones no pueden lograrse simplemente mezclando formulaciones de las dos. Por ejemplo, las concentraciones de NaCl y el pH correctos son críticos para la estabilidad de las coformulaciones de insulina y de enzima degradante de hialuronano

(por ejemplo, rHuPH20 u otras hialuronidasas y enzimas degradantes de hialuronano solubles). La determinación de la concentración de NaCl y el pH óptimos es complicada debido a los efectos opuestos que tienen estos parámetros en la insulina y en la enzima degradante de hialuronano ejemplar, rHuPH20. La solubilidad de la insulina es máxima a mayor pH y menor concentración de NaCl. Estas condiciones, sin embargo, son perjudiciales para rHuPH20, que pierde estabilidad a mayor pH y menor concentración de NaCl. La estabilidad de la enzima degradante de hialuronano ejemplar, rHuPH20, puede aumentarse aumentando las concentraciones de NaCl y disminuyendo el pH. Sin embargo, dichas condiciones tienen un efecto negativo en la solubilidad de la insulina y análogos de insulina, que se precipitan a menor pH y alta concentración de NaCl. Por lo tanto, entre los objetos del presente documento se encuentra proporcionar concentraciones de NaCl y pH óptimos para formulaciones estables de insulina y rHuPH20 (u otras hialuronidasas y enzimas degradantes de hialuronidasas solubles) o proporcionar coformulaciones estables que no contienen NaCl o que contienen concentraciones menores de NaCl.

Tal como se describe en el presente documento, las diferentes formulaciones estables pueden usarse para múltiple inyección de fármaco (MDI) o pueden usarse para infusión de insulina subcutánea continua (CSII). Los dos modos de administración tienen diferentes requisitos de estabilidad. En particular, las coformulaciones para CSII tienen que ser estables en condiciones aceleradas (o de estrés), tales como temperaturas elevadas y en agitación, mientras que las coformulaciones para MDI, que pueden almacenarse a temperaturas refrigeradas o ambientales hasta su uso, no necesitan ser estables a temperaturas elevadas y con agitación. Por lo tanto, tal como se describe en otras partes del presente documento, los excipientes o concentraciones de excipientes que promueven la estabilidad en cada una de estas condiciones de almacenamiento no son necesariamente los mismos. Por ejemplo, se requieren excipientes o estabilizantes adicionales o diferentes concentraciones de excipientes o estabilizantes para mantener la estabilidad a o a aproximadamente 32-40 °C o en agitación de las que son necesarias para mantener la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano y/o la insulina a o a aproximadamente 20-30 °C o a o a aproximadamente 2-8 °C. Estos mismos estabilizantes pueden no ser compatibles con la estabilidad de las formulaciones a menores temperaturas.

Por ejemplo, en el presente documento se observa que mientras que la insulina no es generalmente estable a altas concentraciones de NaCl y condiciones de bajo pH cuando se almacenan o usan a bajas temperaturas menores de 32 °C, dichas condiciones producen solubilidad de insulina a temperaturas mayores de 32 °C a 40 °C durante al menos 3 días. Por lo tanto, las condiciones de alto NaCl y bajo pH pueden presentarse en coformulaciones para su uso durante la CSII, que es una terapia de administración que requiere estabilidad a temperaturas mayores. En el presente documento se demuestra que las formulaciones que contienen bajo pH (por ejemplo, pH 6,8) y alto NaCl, (por ejemplo, 200 mM) son estables a temperaturas elevadas, y por lo tanto son adecuadas para la CSII durante al menos 3 días a 37 °C. El bajo pH (por ejemplo, pH 6,8) y alto NaCl (por ejemplo, 200 mM) no son adecuados para la estabilidad a menores temperaturas de almacenamiento, tales como a temperaturas refrigeradas o ambientales.

Asimismo, el estabilizante hialuronano (HA) es un estabilizante eficaz y mantiene la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano a temperaturas elevadas para su uso en la CSII sin mostrar cualquier efecto perjudicial en la solubilidad de la insulina. En este caso, mientras que el hialuronano promueve la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano a temperaturas elevadas, se reduce la solubilidad de la insulina a temperaturas refrigeradas. Por lo tanto, la presencia de HA en una formulación de MDI para almacenamiento a largo plazo a temperaturas menores puede tener impacto en la solubilidad de la insulina.

En el presente documento también se observa que Lys-Lys es un estabilizante particularmente bueno de una enzima degradante de hialuronano, en particular a temperaturas mayores de 37 °C. A diferencia del MgCl₂, que también es un estabilizante particularmente fuerte de la enzima degradante de hialuronano a temperaturas elevadas, puede hacerse que Lys-Lys sea compatible con las insulinas a la vez que se mantiene la solubilidad. Por ejemplo, menores concentraciones de Lys-Lys y la presencia de uno o más estabilizantes retiene la actividad de la enzima degradante de hialuronano y la solubilidad de la insulina en condiciones aceleradas, tales como temperaturas elevadas. Por lo tanto, dichas coformulaciones que contienen Lys-Lys también pueden ser adecuadas para aplicaciones de CSII.

Aunque los excipientes o concentraciones de excipientes para una formulación estable de MDI o CSII no son necesariamente los mismos, las formulaciones de MDI proporcionadas en el presente documento pueden usarse para generar formulaciones de CSII estables. Por lo tanto, en algunos ejemplo, las coformulaciones de MDI, que son estables a temperaturas refrigeradas y ambientales pero no necesariamente a temperaturas elevadas y bajo estrés, se diluyen con un diluyente que tiene un menor pH y una mayor concentración de sal. Esto produce una formulación con un pH menor y mayor concentración de sal en comparación con la formulación de MDI, y que por lo tanto es estable a temperaturas y condiciones de estrés elevadas (por ejemplo, en agitación) y son adecuadas para CSII. Típicamente, dichas coformulaciones de CSII no se almacenan a temperaturas elevadas debido a la insolubilidad de la insulina en composiciones con bajo pH y alta concentración de sal.

Típicamente, los compuestos se formulan en composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta edición, 1985, 126). Las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan en previsión de su aprobación por una agencia reguladora u otra agencia, preparadas de acuerdo con farmacopeas generalmente reconocidas para su uso en animales y seres humanos. La formulación debe ajustarse al modo de administración.

Las coformulaciones pueden proporcionarse como una preparación farmacéutica en forma líquida como soluciones, jarabes o suspensiones. En forma líquida, las preparaciones farmacéuticas pueden proporcionarse en forma de una preparación concentrada para diluirse en una concentración terapéuticamente eficaz antes de su uso. En general, las preparaciones se proporcionan en una forma de dosificación que no necesita dilución para su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). En otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden presentarse en forma liofilizada para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

El volumen de las coformulaciones proporcionadas en el presente documento puede ser cualquier volumen adecuado para el envase en el que se proporcionan. En algunos ejemplos, las coformulaciones se proporcionan en un vial, jeringa, bolígrafo, reservorio para una bomba o un sistema de bucle cerrado, o cualquier otro envase adecuado. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento son de entre o entre aproximadamente 0,1 ml a 500 ml, tales como 0,1 ml a 100 ml, 1 ml a 100 ml, 0,1 ml a 50 ml, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 0,1 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml o más.

Tal como se describe más adelante en el presente documento, en algunos ejemplos, las coformulaciones se preparan en forma de formulaciones concentradas de insulina y enzimas degradantes de hialuronano, que posteriormente se diluyen con un diluyente adecuado para su uso. En dichos casos, las coformulaciones concentradas pueden formularse específicamente para almacenamiento a largo plazo a, por ejemplo, de o desde aproximadamente 2 °C a o a aproximadamente 8 °C. Tras su dilución, la coformulación puede usarse directamente para aplicaciones de MDI. Por otra parte, ya que pueden ser diferentes los requisitos para las formulaciones multidosis usadas MDI o para terapia de CSII, pueden seleccionarse los componentes del diluyente para asegurar la estabilidad de la coformulación diluida para aplicaciones de la coformulación a temperaturas elevadas o en agitación. Por ejemplo, tal como se discute anteriormente y adicionalmente más adelante, el diluyente puede contener, por ejemplo, una cantidad o nivel necesario de componentes o agentes estabilizantes que sea compatible con la estabilidad de la coformulación a temperaturas elevadas o en condiciones de estrés (por ejemplo, agitación), que son condiciones características de la terapia de CSII. Por lo tanto, cuando la coformulación concentrada de insulina y enzima degradante de hialuronano se diluye con el diluyente, la nueva coformulación diluida es estable a, por ejemplo, temperaturas elevadas, tales como al menos o aproximadamente al menos 32 °C a 40 °C, tales como aproximadamente o 37 °C u otras condiciones de estrés (por ejemplo, agitación), por ejemplo, para su uso en terapia de CSII.

A continuación se proporciona una descripción de los componentes que se proporcionan en las coformulaciones estables en el presente documento. El particular equilibrio de requisitos para maximizar la estabilidad de ambas proteínas contenidas en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento hacen que pueda lograrse la administración con una formulación inyectable multidosis y con un sistema de CSII (por ejemplo, administración de bomba cerrada) de la coformulación. A continuación se proporciona una descripción de cada uno de los componentes o condiciones, tales como excipientes, estabilizantes o pH.

1. Componentes de coformulaciones estables

En el presente documento se proporcionan coformulaciones estables que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20). Las coformulaciones también contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida, tal como un análogo de insulina de acción rápida (por ejemplo, de rápida acción). En los ejemplos de coformulaciones proporcionadas en el presente documento, las coformulaciones contienen además NaCl a una concentración de entre o aproximadamente entre 50 mM a 200 mM, tal como de 80-140 mM, un pH de entre o aproximadamente entre 6,5 a 8,0, por ejemplo, de 6,5 a 7,8 o de 6,8 a 7,8, tal como de entre o de aproximadamente entre 6,5 a 7,5 o de 7,0 a 7,6, un agente tamponador que mantiene el intervalo de pH, una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante o de una mezcla de conservantes, y un agente estabilizante en una cantidad que, a lo largo de la duración del almacenamiento (temperatura y tiempo), retiene al menos un 50 % de la actividad de la enzima degradante de hialuronano y retiene al menos el 90 % de la pureza, recuperación y/o potencia de la insulina. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen de un 0,01 % a un 0,5 % de tensioactivo como agente estabilizante. Las coformulaciones pueden contener opcionalmente agentes estabilizantes adicionales o un agente antioxidante. En algunos ejemplos del presente documento, las coformulaciones son estables durante al menos 6 meses a una temperatura de desde o desde aproximadamente 2 °C a o a aproximadamente 8 °C y durante al menos 14 días (es decir, 2 semanas) a una temperatura de desde o de aproximadamente 20 °C a o a aproximadamente 30 °C. Dichas coformulaciones pueden usarse para su uso en inyección multidosis (MDI). En otros ejemplos, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento son estables en condiciones aceleradas, tales como temperaturas elevadas mayores de o aproximadamente mayores de 32 °C, tales como de 35 °C a 40 °C, en particular mayor de o de aproximadamente o de 37 °C o 40 °C y/o

condiciones de agitación durante al menos 3 horas, y generalmente al menos 3 días. Dichas coformulaciones pueden usarse para métodos de infusión de insulina continua (CSII).

5 También se proporcionan en el presente documento coformulaciones que no contienen NaCl o que contienen una cantidad menor de NaCl, tal como menos de 140 mM de NaCl, y generalmente de 0 mM a 100 mM de NaCl, por ejemplo, 0 mM a 50 mM, 10 mM a 40 mM, 20 mM a 30 mM, tal como al menos o aproximadamente al menos o de 30 mM de NaCl. En dichos ejemplos, se observa en el presente documento que puede incluirse Lys-Lys en una cantidad para estabilizar a la enzima degradante de hialuronano y a la insulina, incluso en ausencia de NaCl. De manera opcional, el NaCl puede incluirse en dichas formulaciones, por ejemplo, como un modificador de la tonicidad. 10 Esto puede ser necesario, por ejemplo, si la concentración de Lys-Lys es de 50 mM de Lys-Lys o menos.

Por lo tanto, en algunos ejemplos de las coformulaciones proporcionadas en el presente documento, las coformulaciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20). Las coformulaciones también contienen 15 una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida, tal como un análogo de insulina de acción rápida (por ejemplo, de rápida acción). En los ejemplos de coformulaciones proporcionadas en el presente documento, las coformulaciones contienen además Lys-Lys a una concentración de entre o aproximadamente entre 50 mM a 120 mM, tal como de 50 a 80 mM, 80 mM a 100 mM o 100 mM a 120 mM, un pH de entre o aproximadamente entre 6,5 a 8,0, por ejemplo, de 6,5 a 7,8 o de 6,8 a 7,8, tal como de entre o de aproximadamente 20 entre 6,5 a 7,5 o de 7,0 a 7,6, un agente tamponador que mantiene el intervalo de pH, una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante o de una mezcla de conservantes, y un agente estabilizante en una cantidad que, a lo largo de la duración del almacenamiento (temperatura y tiempo), retiene al menos un 50 % de la actividad de la enzima degradante de hialuronano y retiene al menos el 90 % de la pureza, recuperación y/o potencia de la insulina. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen de un 25 0,0005 % a un 1,0 % (por ejemplo, de un 0,0005 % a un 0,005 %) de tensioactivo como agente estabilizante. Las coformulaciones pueden contener opcionalmente agentes estabilizantes adicionales, modificadores de la tonicidad, un agente antioxidante y/u otros excipientes. Por ejemplo, las coformulaciones contienen NaCl a una concentración de menos de 140 mM, tal como de entre o aproximadamente entre 0 mM a 100 mM, por ejemplo, entre o aproximadamente entre 0 mM a 50 mM, 10 mM a 40 mM o 20 mM a 30 mM. En algunos ejemplos del presente documento, las coformulaciones son estables durante al menos 6 meses a una temperatura de desde o desde 30 aproximadamente 2 °C a o a aproximadamente 8 °C y durante al menos 14 días (es decir, 2 semanas) a una temperatura de desde o de aproximadamente 20 °C a o a aproximadamente 30 °C. Dichas coformulaciones pueden usarse para su uso en inyección multidosis (MDI). En otros ejemplos, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento son estables en condiciones aceleradas, tales como temperaturas elevadas mayores de o 35 aproximadamente mayores de 32 °C, tales como de 35 °C a 40 °C, en particular mayor de o de aproximadamente de 37 °C o 40 °C y/o condiciones de agitación durante al menos 3 horas, y generalmente al menos 3 días. Dichas coformulaciones pueden usarse para métodos de infusión de insulina continua (CSII).

40 a. Insulina de acción rápida

Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida, tal como un análogo de insulina de acción rápida. La insulina puede ser cualquier insulina de acción rápida tal como se describe en la sección E. La insulina de acción rápida puede ser insulina regular. En ejemplos particulares, la insulina es una insulina de acción rápida que es un análogo de insulina de 45 acción rápida, por ejemplo, insulina lispro, insulina aspart o insulina glulisina. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad de entre o de aproximadamente entre 10 Unidades/ml a 1000 U/ml, 100 U/ml a 1000 U/ml, o 500 U/ml a 1000 U/ml, tal como al menos o aproximadamente al menos 10 U/ml, 20 U/ml, 30 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 250 U/ml, 300 U/ml, 350 U/ml, 400 U/ml, 450 U/ml, 500 U/ml o 1000 U/ml. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el 50 presente documento contienen una insulina de acción rápida, tal como un análogo de insulina de acción rápida (por ejemplo, insulina lispro, insulina aspart o insulina glulisina) en una cantidad que es de al menos o de al menos aproximadamente o es o es de aproximadamente 100 U/ml.

En las formulaciones estables proporcionadas en el presente documento, la estabilidad de la insulina, incluyendo 55 análogos de insulina, en las formulaciones es una función de la recuperación, pureza y/o actividad de la insulina en almacenamiento a diversas temperaturas (por ejemplo, de 2 °C-8 °C, 20 °C-30 °C o temperaturas elevadas de al menos o aproximadamente 32 °C a 40 °C) y tiempos (por ejemplo, horas, días, días o semanas) o condiciones de uso (por ejemplo, agitación) tal como se describen en el presente documento. Los ensayos para evaluar estos parámetros se discuten más adelante. Las formulaciones proporcionadas en el presente documento retienen la 60 recuperación, pureza y/o actividad de insulina de tal forma que las formulaciones son adecuadas para uso terapéutico tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en las formulaciones proporcionadas en el presente documento, la pureza de la insulina (por ejemplo, evaluada mediante RP-HPLC u otro método similar) a lo largo del tiempo y en condiciones de almacenamiento o uso tal como se describen en el presente documento es de al menos el 85 % de la pureza de la insulina en la formulación antes de su almacenamiento o uso, por ejemplo, al 65 menos el 90 %, 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o más. En general, para la pureza de insulina (por ejemplo, mediante RP-HPLC) la especificación diana aceptable es de al menos o aproximadamente el

90 % de pureza o aproximadamente o más del 90 % de pureza. En otros ejemplos, la pureza de la insulina puede evaluarse como una función de la agregación de la insulina, por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) no desnaturalizante o desnaturalizante. En dichos ejemplos, en las formulaciones proporcionadas en el presente documento, a lo largo del tiempo y en condiciones de almacenamiento o uso tal como se describen en el presente documento la insulina en la formulación contiene menos de un 2 % de especies de insulina de alto peso molecular (HMWt) por pico de área, por ejemplo, menos del 1,9 %, 1,8 %; 1,7 %; 1,6 %; 1,5 %; 1,4 %; 1,3 %; 1,2 %; 1,1 %; 1,0 % o menos. A lo largo del tiempo (por ejemplo, horas, días, semanas o meses) y en condiciones de almacenamiento (por ejemplo, a diversas temperaturas y tiempo) o de uso (por ejemplo, agitación) tal como se describen en el presente documento, la insulina en las formulaciones proporcionadas en el presente documento retiene más de o aproximadamente un 90 %, 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o más de su recuperación o actividad. Por lo tanto, en una solución formulada con 100 Unidades/ml de insulina, al menos o aproximadamente 90 U/ml, 91 U/ml, 92 U/ml, 93 U/ml, 94 U/ml, 95 U/ml, 96 U/ml, 97 U/ml, 98 U/ml o 99 U/ml permanecen durante un tiempo de horas, días, semanas o meses en almacenamiento o uso a temperaturas de 2 °C-8 °C, 20 °C-30 °C o temperaturas elevadas de al menos o aproximadamente 32 °C a 40 °C o en condiciones de agitación tal como se describen en el presente documento.

b. Enzima degradante de hialuronano

Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima degradante de hialuronano, tales como cualquiera descrita en la sección C, por ejemplo, una hialuronidasa tal como una PH20 (por ejemplo, rHuPH20). La cantidad de enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento es una cantidad que es suficiente para hacer que la composición sea de acción súper rápida. Por ejemplo, la cantidad es funcionalmente equivalente a al menos o aproximadamente al menos 30 Unidades/ml. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) en una cantidad de entre o aproximadamente entre 30 Unidades/ml a 20.000 U/ml, 300 U/ml a 15.000 U/ml, 300 U/ml a 10.000 U/ml, 300 U/ml a 5.000 U/ml, 300 U/ml a 3000 U/ml, 300 U/ml a 2000 U/ml, 600 U/ml a 20.000 U/ml, 600 U/ml a 15.000 U/ml, 600 U/ml a 10.000 U/ml, 600 U/ml a 6000 U/ml, 600 U/ml a 4000 U/ml, 600 U/ml a 2000 U/ml, 600 U/ml a 1000 U/ml, 60 U/ml a 600 U/ml, o 100 U/ml a 300 U/ml, tal como al menos o aproximadamente al menos 30 U/ml, 35 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/ml, 600 U/ml, 700 U/ml, 800 U/ml, 900 U/ml, 1000 U/ml, 2000 U/ml, 3000 U/ml, 4000 U/ml, 5000 U/ml, 6000 U/ml, 7000 U/ml, 8000 U/ml, 9000 U/ml, 10.000 U/ml, 12.000 U/ml, 15.000 U/ml o 20.000 U/ml. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) que está en una cantidad que es al menos de 100 U/ml a 1000 U/ml, por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente o de 600 U/ml.

En las coformulaciones proporcionadas en el presente documento, la estabilidad de una enzima degradante de hialuronano, incluyendo una hialuronidasa, tal como una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), es una función de la recuperación y/o actividad de la enzima en almacenamiento a diversas temperaturas (por ejemplo, de 2 °C-8 °C, 20 °C-30 °C o temperaturas elevadas de al menos o aproximadamente 32 °C a 40 °C) y tiempos (por ejemplo, horas, días, días o semanas) o condiciones de uso (por ejemplo, agitación) tal como se describen en el presente documento. Los ensayos para evaluar estos parámetros se discuten más adelante. Las formulaciones proporcionadas en el presente documento retienen recuperación y/o actividad de hialuronidasa de tal forma que las formulaciones son adecuadas para uso terapéutico tal como se describe en el presente documento. En las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento, la actividad de la enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20, es típicamente mayor de o de aproximadamente el 50 %, tal como mayor de o al menos el 55 %, 60 %; 65 %; 70 %; 80 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % o más de la actividad de la enzima en la formulación antes de su almacenamiento o uso. En general, para la actividad de hialuronidasa, la especificación diana aceptable de estabilidad es de al menos el 62 % de la actividad de la enzima durante horas, días, semanas o meses en almacenamiento o uso a temperaturas de 2 °C-8 °C, 20 °C-30 °C o temperaturas elevadas de al menos o aproximadamente 32 °C a 40 °C o en condiciones de agitación tal como se describen en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, en una solución formulada con 600 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, por ejemplo, rHuPH20, al menos o aproximadamente al menos 360 Unidades/ml, 365 U/ml, 370 U/ml, 375 U/ml, 380 U/ml, 390 U/ml, 420 U/ml, 480 U/ml, 540 U/ml, 546 U/ml, 552 U/ml, 558 U/ml, 564 U/ml, 570 U/ml, 576 U/ml, 582 U/ml, 588 U/ml, 594 U/ml o más de actividad se retienen a lo largo del tiempo y en condiciones de almacenamiento o uso. Por ejemplo, en las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento, a lo largo del tiempo y en condiciones de almacenamiento o uso (por ejemplo, agitación), se retienen al menos 375 U/ml de la actividad de enzima degradante de hialuronano. En otros ejemplos, la estabilidad puede evaluarse como una función de la recuperación de la enzima, por ejemplo, usando RP-HPLC. En dichos ejemplos, en las formulaciones proporcionadas en el presente documento la recuperación de la enzima hialuronidasa es desde entre o aproximadamente entre el 60 % al 140 %. Por ejemplo, en las formulaciones proporcionadas en el presente documento la recuperación de la enzima hialuronidasa es desde entre o aproximadamente entre 3-7 mg/ml.

65 c. Conservante

Para su uso como una formulación multidosis, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen un conservante (o conservantes). Tal como se ha discutido anteriormente, los conservantes pueden tener un efecto perjudicial en la solubilidad de la insulina y en la estabilidad y actividad de las enzimas degradantes de hialuronano, tales como PH20 (por ejemplo, rHuPH20), mientras que a la vez se estabilizan las moléculas de insulina hexaméricas según sea necesario como agente antimicrobiano en formulaciones multidosis. Por lo tanto, uno de los objetos del presente documento es identificar el tipo y concentración de conservante (o conservantes) que pueden usarse en coformulaciones estables de insulina, incluyendo análogos de insulina de acción rápida, y enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas solubles (por ejemplo, rHuPH20).

Los uno o más conservantes presentes en la coformulación no pueden desestabilizar sustancialmente a la enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), de tal forma que pierde su actividad a lo largo de las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, a lo largo del tiempo y a una temperatura variada) tal como se describe en el presente documento. Además, estos conservantes tienen que estar presentes en una concentración suficiente para estabilizar a los hexámeros de insulina y ejercen el efecto antimicrobiano requerido, pero no estar tan concentrados como para disminuir la solubilidad de la insulina. De manera importante, los conservantes tienen que estar presentes a una concentración suficiente para proporcionar los requisitos antimicrobianos de, por ejemplo, la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y de la Farmacopea Europea (EP). La tabla 23, en el ejemplo 7E más adelante, expone estos requisitos, incluyendo los requisitos antimicrobianos EP mínimos (EPA) y los requisitos antimicrobianos EP preferidos (EPB). Típicamente, las formulaciones que cumplen con los requisitos antimicrobianos EP (EPA o EPB) contienen más conservante que aquellas formuladas solo para cumplir con los requisitos antimicrobianos USP.

Por lo tanto, las formulaciones proporcionadas en el presente documento contienen conservantes en una cantidad que muestra actividad antimicrobiana eliminando o inhibiendo la propagación de organismos microbianos en una muestra de la composición según se evalúa en una prueba de eficacia conservante antimicrobiana (APET). Un experto en la materia está materializado con la prueba de eficacia conservante antimicrobiana y los estándares que hay que cumplir de acuerdo con la USP y la EPA o EPB para cumplir con los requisitos mínimos. En general, la prueba de eficacia conservante antimicrobiana implica exponer a una composición, por ejemplo, una coformulación proporcionada en el presente documento, con inóculos prescritos de microorganismos adecuados, es decir, bacterias, levaduras y hongos, almacenar la preparación inoculada a una temperatura prescrita, extraer muestras a intervalos de tiempo específicos y contar los organismos en la muestra (véase, Sutton y Porter, (2002) PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 56(6);300-311; The United States Pharmacopeial Convention, Inc., (en vigor el 1 de enero de 2002), The United States Pharmacopeia 25th Revision, Rockville, MD, Capítulo <51> Antimicrobial Effectiveness Testing; y European Pharmacopoeia, Capítulo 5.1.3, Efficacy of Antimicrobial Preservation). Los microorganismos usados en la exposición incluyen generalmente tres cepas de bacterias, a saber *E. coli* (ATCC n.º 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC n.º 9027) y *Staphylococcus aureus* (ATCC n.º 6538), levaduras (*Candida albicans* ATCC n.º 10231) y hongos (*Aspergillus niger* ATCC n.º 16404), todos los cuales se añaden de tal forma que la composición inoculada contiene 10^5 o 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc) de microorganismos por ml de composición. Las propiedades conservantes de la composición se consideran adecuadas si, en las condiciones de la prueba, hay una disminución significativa o un aumento nulo, tal como se especifica en la tabla 6, a continuación, en la serie de microorganismos en la composición inoculada después de los tiempos y temperaturas prescritas. Los criterios de evaluación se proporcionan en términos de la reducción logarítmica en el número de microorganismos viables en comparación con la muestra inicial o con el instante de tiempo previo.

Tabla 6. Requisitos USP y EP para prueba de eficacia antimicrobiana	
USP	Criterios para aprobar
Bacterias	Reducción no menor de 1,0 log del recuento inicial calculado a los 7 días, reducción no menor de 3,0 log del recuento inicial a los 14 días, y aumento nulo desde el recuento a los 14 días a los 28 días. Aumento nulo se define como no más de 0,5 log ₁₀ unidades mayor que el valor medido previamente.
Levadura o moho	Aumento nulo desde el recuento inicial calculado a los 7, 14 y 28 días. Aumento nulo se define como no más de 0,5 log ₁₀ unidades mayor que el valor medido previamente.
EPA	Criterios para aprobar
Bacterias	Reducción de 2 log en el número de microorganismos viables frente al valor obtenido para el inóculo a las 6 horas, una reducción de 3 log en el número de microorganismos viables frente al valor obtenido para el inóculo a las 24 horas y recuperación nula a los 28 días.
Levadura o moho	Reducción de 2 log en el número de microorganismos viables frente al valor obtenido para el inóculo a los 7 días y aumento nulo a los 28 días. Aumento nulo se define como no más de 0,5 log ₁₀ unidades mayor que el valor medido previamente.
EPB	Criterios para aprobar

Bacterias	Reducción de 1 log en el número de microorganismos viables frente al valor obtenido para el inóculo a las 24 horas, una reducción de 3 log en el número de microorganismos viables frente al valor obtenido para el inóculo a los 7 días y aumento nulo a los 28 días. Aumento nulo se define como no más de 0,5 log ₁₀ unidades mayor que el valor medido previamente.
Levadura o moho	Reducción de 1 log en el número de microorganismos viables frente al valor obtenido para el inóculo a los 7 días y aumento nulo a los 28 días. Aumento nulo se define como no más de 0,5 log ₁₀ unidades mayor que el valor medido previamente.

5 Específicamente, la composición, por ejemplo, la coformulación, se reparte en alícuotas en al menos 5 envases, una para cada una de las bacterias u hongos (*Escherichia coli* (ATCC n.º 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC n.º 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC n.º 6538), *Candida albicans* (ATCC n.º 10231) y *Aspergillus niger* (ATCC n.º 16404)).
 10 Entonces se inocula cada envase con uno de los organismos de la prueba para proporcionar un inóculo de 10⁵ o 10⁶ microorganismos por ml de la composición, no superando el inóculo el 1 % del volumen de la composición. Las composiciones inoculadas se mantienen a una temperatura entre 20 y 25 °C durante un periodo de 28 días, y se extraen muestras a las 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días, dependiendo de los criterios expuestos en la tabla 6 anterior. El número de microorganismos viables (ufc) en cada muestra se determina mediante recuento de placas o filtración en membrana. Finalmente, se comparan las ufc para cada muestra con el inóculo o la muestra anterior y se determina la reducción logarítmica.

15 Según los estándares USP, la velocidad o el nivel de actividad antimicrobiana de los conservantes en las muestras inoculadas con los organismos microbianos es una reducción de al menos 1,0 log₁₀ unidades de los organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación; una reducción de al menos 3,0 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a los 14 días después de la inoculación; y al menos adicionalmente un aumento nulo, es decir, un aumento de no más de 0,5 log₁₀ unidades, en los organismos bacterianos desde el día 14 al día 28 después de la inoculación de la composición con el inóculo microbiano. Para los organismos fúngicos de acuerdo con los estándares USP, la velocidad o el nivel de actividad antimicrobiana de los conservantes en las muestras inoculadas con los organismos microbianos es al menos un aumento nulo respecto de la cantidad inicial después de 7, 14 y 28 días después de la inoculación de la composición con el inóculo microbiano. Según la EPB, o los estándares EP mínimos, la velocidad o el nivel de actividad antimicrobiana de los conservantes en las muestras inoculadas con los organismos microbianos es una reducción de al menos 1 log₁₀ unidades de los organismos bacterianos a las 24 horas después de la inoculación; una reducción de al menos 3 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a los 7 días después de la inoculación; y al menos adicionalmente un aumento nulo, es decir, un aumento de no más de 0,5 log₁₀ unidades, en los organismos bacterianos 28 días después de la inoculación de la composición con el inóculo microbiano. Los estándares EPA requieren una reducción de al menos 2 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a las 6 horas después de la inoculación, con una reducción de al menos 3 log₁₀ unidades de organismos bacterianos a las 24 horas después de la inoculación, y una recuperación nula de organismos microbianos a los 28 días después de la inoculación. Para los organismos fúngicos de acuerdo con los estándares EPB mínimos, la velocidad o el nivel de actividad antimicrobiana de los conservantes en las muestras inoculadas con organismos microbianos es una reducción de al menos 1 log 10 unidades de organismos fúngicos a los 14 días después de la inoculación y un aumento nulo en los organismos fúngicos a los 28 días después de la inoculación de la composición, y los estándares EPA aumentados requieren una reducción de 2 log₁₀ unidades a los 7 días después de la inoculación y un aumento nulo en los organismos fúngicos a los 28 días después de la inoculación de la composición.

40 Los ejemplos no limitantes de conservantes que pueden incluirse en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, fenol, meta-cresol (m-cresol), el metilparabeno, alcohol bencílico, timerosal, cloruro de benzalconio, 4-cloro-1-butanol, diclorhidrato de clorhexidina, digluconato de clorhexidina, L-fenilalanina, EDTA, bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), acetato fenilmercúrico, glicerol (glicerina), imidourea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, orto-cresol (o-cresol), para-cresol (p-cresol), clorocresol, ceftrima, cloruro de bencetonio, etilparabeno, propilparabeno o butilparabeno y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden contener un solo conservante. En otros ejemplos, las coformulaciones contienen al menos dos conservantes diferentes o al menos tres conservantes diferentes. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden contener dos conservantes, tales como L-fenilalanina y m-cresol, L-fenilalanina y metilparabeno, L-fenilalanina y fenol, m-cresol y metilparabeno, fenol y metilparabeno, m-cresol y fenol u otras combinaciones similares. En un ejemplo, el conservante en la coformulación contiene al menos un conservante fenólico. Por ejemplo, la coformulación contiene fenol, m-cresol o fenol y m-cresol.

50 En las formulaciones proporcionadas en el presente documento, la cantidad total de los uno o más agentes conservantes como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) en la formulación puede ser, por ejemplo, de entre o de entre aproximadamente del 0,1 % al 0,4 %, tal como del 0,1 % al 0,3 %, del 0,15 % al 0,325 %, del 0,15 % al 0,25 %, del 0,1 % al 0,2 %, del 0,2 % al 0,3 %, o del 0,3 % al 0,4 %. En general, las coformulaciones contienen menos del 0,4 % (p/v) de conservante. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen al menos o aproximadamente al menos un 0,1 %, 0,12 %; 0,125 %; 0,13 %; 0,14 %; 0,15 %; 0,16 %; 0,17 %; 0,175 %; 0,18 %; 0,19 %; 0,2 %; 0,25 %; 0,3 %; 0,325 %; 0,35 % pero menos de un 0,4 % en total de conservante.

Los conservantes ejemplares usados en las coformulaciones adecuadas de insulina y enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) son fenol y m-cresol. En algunos ejemplos, el porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de fenol en la coformulación es mayor que el porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de m-cresol. Esto se debe, al menos en parte, a los efectos más perjudiciales de m-cresol en la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, rHuPH20) en solución, particularmente a temperaturas elevadas, en comparación con fenol (véase, por ejemplo, el ejemplo 7). Por lo tanto, en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento, la relación como porcentaje de concentración en masa de fenol:meta-cresol es mayor que o es de aproximadamente 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1, 2,9:1, 3:1 o más.

En algunos ejemplos, las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento contienen entre o entre aproximadamente un 0,1 % a un 0,25 % de fenol, y entre o aproximadamente el 0,05 % al 0,2 % de m-cresol, tal como entre o aproximadamente entre el 0,10 % al 0,2 % de fenol y entre o aproximadamente entre el 0,06 % al 0,18 % de m-cresol o es de entre o aproximadamente entre el 0,1 % al 0,15 % de fenol y entre o aproximadamente entre el 0,08 % al 0,15 % de m-cresol. Por ejemplo, las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento contienen o contienen aproximadamente un 0,1 % de fenol y un 0,075 % de m-cresol; 0,1 % de fenol y 0,15 % de m-cresol; 0,125 % de fenol y 0,075 % de m-cresol; 0,13 % de fenol y 0,075 % de m-cresol; 0,13 % de fenol y 0,08 % de m-cresol; 0,15 % de fenol y 0,175 % de m-cresol; o 0,17 % de fenol y 0,13 % de m-cresol.

20 d. NaCl

Los ejemplos de coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) pueden contener NaCl como agente estabilizante. En las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que contienen NaCl como agente estabilizante, la coformulación puede tener una concentración de NaCl de entre o aproximadamente entre 50 mM a 200 mM, tal como de entre o aproximadamente entre 80 mM a 140 mM, 80 mM a 120 mM, 80 mM a 100 mM, 100 mM a 140 mM o 120 mM a 140 mM. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan coformulaciones de insulina y una enzima degradante de hialuronano que contienen aproximadamente o al menos 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 85mM, 90 mM, 95 mM, 100 mM, 105 mM, 110 mM, 115 mM, 120 mM, 125 mM, 130 mM, 135 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM o 200 mM de NaCl.

Además, en el presente documento se observa que mientras que las insulinas generalmente no son lo suficientemente solubles en condiciones de alta concentración de NaCl y bajo pH, en las que la actividad de una enzima degradante de hialuronano es óptima, la solubilidad de la insulina se ve menos afectada por el NaCl en condiciones aceleradas de temperatura elevada. Por lo tanto, las coformulaciones que son estables en condiciones aceleradas (por ejemplo, temperatura elevada o agitación), tales como aquellas usadas para terapia de CSII, contienen típicamente una mayor concentración de NaCl que las formulaciones que son estables a temperaturas menores de 32 °C.

También se entiende que en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento, el pH particular en la coformulación puede ser una función de las concentraciones de NaCl, y vice versa. Por ejemplo, en las coformulaciones que contienen un pH de o de aproximadamente 7,2, por ejemplo, $7,2 \pm 0,2$ o menor, las coformulaciones contienen generalmente una concentración de sal de o de aproximadamente entre 100 mM a 140 mM. En la coformulación que contiene un pH de o de aproximadamente 7,3, por ejemplo, $7,3 \pm 0,2$ o mayor, las coformulaciones contienen generalmente una concentración de sal de o de aproximadamente entre 50 a 100 mM de NaCl.

Asimismo, tal como se expone en los ejemplos en el presente documento, la insulina y los análogos de insulina que tienen cada uno diferentes requisitos de solubilidad, que está influenciada por el nivel de NaCl y pH en la formulación. En general, la insulina y la solubilidad de la insulina se favorece por el alto pH y baja salinidad. Por ejemplo, la insulina regular forma precipitados tras 1 semana a altas concentraciones de NaCl mayores de 80 mM y a un pH bajo de 7,0. Sin embargo, la insulina regular no forma precipitados a lo largo de cualquier tiempo ensayado mayor de 15 meses con concentraciones de NaCl de 80 mM o menos y un alto pH de 7,6. De manera similar, los análogos de insulina lispro y aspart también muestran efectos dependientes de la salinidad y pH en la solubilidad generalmente formándose precipitados a concentraciones de sal mayores de 80 mM y a un pH bajo de 7,2 o 7,0. Por el contrario, a bajas concentraciones de sal de 80 mM o menores y un pH alto de 7,4 o 7,6, las insulinas muestran mayor estabilidad y una precipitación escasa o nula con el paso del tiempo. La insulina glulisina es la más soluble. Por lo tanto, las insulinas menos solubles toleran menos sal en comparación con las insulinas más solubles. Por lo tanto, debido a la diferente solubilidad aparente de las distintas insulinas, la concentración de sal para las formulaciones proporcionadas en el presente documento puede depender del tipo de insulina en la formulación, ya que la solubilidad de la insulina está relacionada directamente con la tolerancia a la sal.

Se encuentra dentro del nivel de un experto en la materia, a la vista de la descripción en el presente documento, evaluar empíricamente la solubilidad y estabilidad de la insulina y de las enzimas degradantes de hialuronano en el presente documento como una función de la concentración de NaCl, de la insulina particular y de los parámetros de estabilidad requeridos de la formulación particular.

e. pH

En el presente documento se proporcionan coformulaciones estables de insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) que tienen un pH de entre o de aproximadamente entre 6,5 a 8,0, por ejemplo, de 6,5 a 7,8 o de 6,8 a 7,8, tal como de entre o de aproximadamente entre 6,5 a 7,5 o de 7,0 a 7,6. La referencia a pH en el presente documento se basa en la medición de pH a temperatura ambiente. Se entiende que el pH puede cambiar durante el almacenamiento con el paso del tiempo, pero permanecerá típicamente a entre o entre aproximadamente pH 6,5 a 8,0, por ejemplo, entre o aproximadamente entre 6,8 o a aproximadamente 7,8. Por ejemplo, el pH puede variar en $\pm 0,1$, $0,2$, $0,3$, $0,4$, $0,5$, $0,6$, $0,7$, $0,8$, $0,9$, $1,0$, $1,2$, $1,3$, $1,4$, $1,5$ o más. Por lo tanto, se entiende que la referencia a una coformulación que tiene un pH de aproximadamente o al menos pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,6 incluye coformulaciones que tienen un pH de o de aproximadamente o de al menos $7,0 \pm 0,2$, $7,1 \pm 0,2$, $7,2 \pm 0,2$, $7,3 \pm 0,2$, $7,4 \pm 0,2$, $7,5 \pm 0,2$ o $7,6 \pm 0,2$ cuando se preparan.

Ya que tanto la sal como el pH son parámetros contrapuestos que influyen la solubilidad de la insulina y la actividad de una enzima degradante de hialuronano, su inclusión en la coformulación está, por consiguiente, equilibrada. Por lo tanto, por ejemplo, en general, en las formulaciones proporcionadas en el presente documento, cuanto menor sea la concentración, mayor será el pH. En otro ejemplo de las coformulaciones proporcionadas en el presente documento, cuanto mayor sea la concentración de sal, menor será el pH. Se encuentra dentro del nivel de un experto en la materia evaluar empíricamente los requisitos de pH y de sal en las coformulaciones para lograr una estabilidad deseada y para retener la actividad de una enzima degradante de hialuronano y la solubilidad de una insulina, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los requisitos de pH y sal óptimos pueden obtenerse mediante técnicas de formulación conocidas para los expertos en la materia y ejemplificadas en el presente documento. Por ejemplo, el pH y las concentraciones de sal óptimas pueden determinarse evaluando la actividad o recuperación de una enzima degradante de hialuronano y la solubilidad, agregación o recuperación de una insulina a diferentes condiciones de pH y sal usando diversos métodos conocidos para un experto en la materia, por ejemplo, tal como se describe en la sección H.2.

Por ejemplo, tal como se discute en otras partes del presente documento, en el presente documento se observa que mientras que las insulinas generalmente no son lo suficientemente solubles en condiciones de alta concentración de sal y bajo pH, en las que la actividad de una enzima degradante de hialuronano es óptima, la solubilidad de la insulina se ve menos afectada por condiciones de bajo pH en condiciones aceleradas de temperatura elevada. Por lo tanto, las coformulaciones que son estables en condiciones aceleradas (por ejemplo, temperatura elevada o agitación), tales como aquellas usadas para terapia de CSII, contienen típicamente un pH menor que las formulaciones que son estables a temperaturas de menos de $32\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En caso necesario, el pH puede ajustarse usando agentes acidificantes para disminuir el pH o agentes alcalinizantes para aumentar el pH. Los agentes acidificantes ejemplares incluyen, pero sin limitación, ácido acético, ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, solución de fosfato de sodio monobásico, y ácido fosfórico. Los agentes alcalinizantes incluyen, pero sin limitación, solución de fosfato de sodio dibásico, carbonato de sodio, o hidróxido de sodio.

f. Tampones

Puede usarse cualquier tampón en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento en tanto que no afecten adversamente a la estabilidad de la coformulación, y soporten el intervalo de pH necesario. Los ejemplos de tampones particularmente adecuados incluyen tampones Tris, succinato, acetato, fosfato, citrato, aconitato, malato y carbonato. Los expertos en la materia, sin embargo, reconocerán que las formulaciones proporcionadas en el presente documento no están limitadas a un tampón particular, en la medida en la que el tampón proporcione un grado aceptable de estabilidad de pH, o de "capacidad tamponadora" en el intervalo indicado. En general, un tampón tiene una capacidad tamponadora adecuada dentro de aproximadamente 1 unidad de pH de su pK (Lachman et al. 1986). La idoneidad del tampón puede estimarse basándose en tabulaciones de pK publicadas o puede determinarse empíricamente mediante métodos bien conocidos en la técnica. El pH de la solución puede ajustarse al punto deseado dentro del intervalo tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, usando cualquier ácido o base aceptable.

Los tampones que pueden incluirse en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, tampones Tris (trometamina), histidina, fosfato, tales como fosfato de sodio dibásico, y tampones citrato. En general, el agente tamponador está presente en una cantidad para mantener el intervalo de pH de la coformulación entre o aproximadamente entre 6,5 a 8,0, por ejemplo, entre o aproximadamente entre 6,8 a 7,8 tal como entre o aproximadamente 7,0 a 7,6. Dichos agentes tamponadores pueden estar presentes en las coformulaciones a concentraciones de entre o aproximadamente entre 1 mM a 100 mM, tales como 10 mM a 50 mM o 20 mM a 40 mM, tales como de o de aproximadamente 30 mM. Por ejemplo, dichos agentes tamponadores pueden estar presentes en las coformulaciones a una concentración de o de aproximadamente o de al menos 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17

mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, o más.

5 Los ejemplos de tampones en las coformulaciones en el presente documento son tampones de unión no metálicos, tales como Tris, que reducen la precipitación de insulina en comparación con los tampones de unión a metales, tales como tampones fosfato. La inclusión de Tris como tampón en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento tiene beneficios adicionales. Por ejemplo, el pH de una solución que está tamponada con Tris se ve afectado por la temperatura a la que se mantiene la solución. Por lo tanto, cuando las coformulaciones de insulina y enzima degradante de hialuronano se preparan a temperatura ambiente a pH 7,3, tras su refrigeración, el pH
10 aumenta a aproximadamente pH 7,6. Dicho pH promueve la solubilidad de la insulina a una temperatura en donde de otro modo es probable que la insulina sea insoluble. Por el contrario, a temperaturas aumentadas, el pH de la formulación disminuye a aproximadamente pH 7,1, lo que promueve la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano a la que la enzima de otro modo es probable que se vuelva inestable. Por lo tanto, la solubilidad y la estabilidad de la insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, PH20
15 (por ejemplo, rHuPH20) se maximiza cuando las coformulaciones contienen Tris como tampón en comparación con otros tampones. Además, debido a que Tris es un ión positivo, no es necesaria la adición de NaCl en la solución como contraión. Esto también es beneficioso para la estabilidad general de la coformulación debido a que el NaCl a altas concentraciones es perjudicial para la solubilidad de la insulina.

20 Por ejemplo, en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento se incluye Tris a una concentración de o de aproximadamente 10 mM a 50 mM, tales como, por ejemplo, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM. En ejemplos particulares, las coformulaciones contienen o contienen aproximadamente de 20 mM a 20 mM de Tris, tal como de 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM o 30 mM de Tris. En ejemplos particulares, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen Tris a una concentración de o de aproximadamente 30 mM.
25

g. Lys-Lys

30 En los ejemplos en el presente documento, las coformulaciones contienen un catión divalente, y en particular lisil-lisina (dilisina, Lys-Lys), o sal, suficiente para estabilizar la enzima degradante de hialuronano en la coformulación. Por ejemplo, el catión divalente Lys-Lys muestra menos efectos en la solubilidad de la insulina que el $MgCl_2$. La Lys-Lys se proporciona en una cantidad que, cuando se combina con los conservantes, y otros estabilizantes al pH adecuado, tal como se discutió anteriormente, dan como resultado una coformulación estable de tal forma que se retiene la actividad degradante de hialuronano y se minimizan los efectos en la solubilidad de la insulina tal como se
35 ha descrito anteriormente en el presente documento.

Por ejemplo, puede incluirse Lys-Lys en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento en una cantidad de entre o de aproximadamente entre 50 mM a 120 mM, tal como de entre o de aproximadamente entre 50 a 80 mM, 80 a 100 mM o 100 a 120 mM. Por ejemplo, puede incluirse Lys-Lys en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento en una cantidad que es de al menos o de al menos aproximadamente o
40 de 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM o 120 mM.

Típicamente, cuanto mayor sea la concentración de Lys-Lys mejor será la estabilidad de la coformulación que contiene una PH20 y una insulina y análogos de insulina. La cantidad particular de Lys-Lys en la formulación, sin embargo, puede ser una función de la insulina particular. Por ejemplo, para lograr una estabilidad similar en una coformulación, el análogo de insulina glulisina requiere la menor cantidad de Lys-Lys (por ejemplo, de 50 a 105 mM), seguido de los análogos de insulina aspart y lispro (por ejemplo, de 80 a 100 mM), requiriendo la insulina regular la cantidad más alta (por ejemplo, de 100 a 120 mM). Se encuentra dentro del nivel de un experto en la materia, a la vista de la descripción en el presente documento, evaluar empíricamente la solubilidad y estabilidad de la insulina y de las enzimas degradantes de hialuronano en el presente documento como una función de la concentración de Lys-Lys, de la insulina particular y de los parámetros de estabilidad requeridos de la formulación particular.
50

En un ejemplo, las coformulaciones que contienen insulina regular contienen generalmente de 100 a 120 mM de Lys-Lys, tal como al menos o aproximadamente al menos o de 100 mM, 105 mM, 110 mM, 115 mM o 120 mM. En otro ejemplo, las coformulaciones que contienen insulina aspart o insulina lispro contienen de 80 a 120 mM de Lys-Lys, tal como al menos o aproximadamente al menos o de 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM o 100 mM. En un ejemplo adicional, las coformulaciones que contienen insulina glulisina contienen de 50 a 105 mM de Lys-Lys, tal como al menos o aproximadamente al menos o de 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM, 100 mM o 105 mM.
60

Típicamente, en los ejemplos en el presente documento en donde las coformulaciones contienen Lys-Lys, la adición de NaCl como estabilizante no es necesaria para mantener la estabilidad de los componentes. En algunos casos, son necesarios modificadores de la tonicidad por razones de tonicidad. Por ejemplo, si la cantidad de Lys-Lys en la coformulación es menor de 50 mM/ml, puede ser necesario un modificador de la tonicidad. Se encuentra dentro de la capacidad de un experto en la materia determinar si debe incluirse un modificador de la tonicidad en la coformulación. Tal como se discute más adelante, los modificadores de la tonicidad ejemplares incluyen, pero sin
65

limitación, glicerina, NaCl, aminoácidos, polialcoholes, trehalosa, y otras sales y/o azúcares. De este modo, en algunos ejemplos, las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento que contienen Lys-Lys también pueden contener opcionalmente NaCl. En dichos ejemplos, el NaCl es generalmente menor de 140 mM, y típicamente menor de 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM o menos. La cantidad particular de modificador de la tonicidad puede determinarse empíricamente para retener la actividad enzimática y/o la tonicidad.

h. Excipientes o estabilizantes adicionales ejemplares

Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden contener otros componentes que, cuando se combina con los conservantes, sal y estabilizantes al pH adecuado, tal como se discutió anteriormente, dan como resultado una coformulación estable. Otros componentes incluyen, por ejemplo, uno o más modificadores de la tonicidad, uno o más agentes antioxidantes, cinc u otro estabilizante.

Por ejemplo, la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) se reduce en gran medida en los casos en donde las coformulaciones contienen bajo NaCl, alto pH, la presencia de conservantes y se almacenan a temperaturas elevadas (por ejemplo, de 20 °C a 30 °C o mayores). De manera similar, la estabilidad de la insulina puede verse afectada por estos y otros parámetros. Dicha inestabilidad puede contrarrestarse hasta cierto punto mediante la adición de uno o más estabilizantes. En general, las formulaciones proporcionadas en el presente documento contienen un estabilizante o estabilizantes en una cantidad que, a lo largo de la duración del almacenamiento (temperatura y tiempo), se retiene al menos un 50 % de la actividad inicial (por ejemplo, 375 U/ml) de la enzima degradante de hialuronano.

Entre los tipos de estabilizantes que pueden estar contenidos en las formulaciones proporcionadas en el presente documento están los aminoácidos, derivados de aminoácidos, aminas, azúcares, polioles, sales y tampones, tensioactivos, y otros agentes. Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen al menos un estabilizante. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más estabilizantes. De este modo, pueden incluirse uno cualquiera o más de aminoácidos, derivados de aminoácidos, aminas, azúcares, polioles, sales y tampones, tensioactivos, y otros agentes en las coformulaciones en el presente documento. En general, las coformulaciones en el presente documento contienen al menos un tensioactivo y un tampón adecuado. De manera opcional, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden contener otros estabilizantes adicionales.

Los estabilizantes de aminoácidos ejemplares, derivados de aminoácidos o aminas incluyen, pero sin limitación, L-Arginina, Glutamina, glicina, Lisina, Metionina, Prolina, Lys-Lys, Gly-Gly, óxido de trimetilamina (TMAO) o betaína. Los ejemplos de azúcares y polioles incluyen, pero sin limitación, glicerol, sorbitol, manitol, inositol, sacarosa o trehalosa. Los ejemplos de sales y tampones incluyen, pero sin limitación, cloruro de magnesio, sulfato de sodio, Tris, tal como Tris (100 mM), o benzoato de sodio. Los tensioactivos ejemplares incluyen, pero sin limitación, poloxamer 188 (por ejemplo, Pluronic® F68), polisorbato 80 (PS80), polisorbato 20 (PS20). Otros conservantes incluyen, pero sin limitación, ácido hialurónico (HA), seroalbúmina humana (HSA), ácido fenil butírico, ácido taurocólico, polivinilpirrolidona (PVP) o cinc.

i. Tensioactivo

En algunos ejemplos, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen uno o más tensioactivos. Dichos tensioactivos inhiben la agregación de la enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) y minimizar la pérdida de absorción. Los tensioactivos son generalmente tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos que pueden incluirse en las coformulaciones en el presente documento incluyen, pero sin limitación, ésteres parciales y de ácidos grasos y éteres de alcoholes polihídricos, tales como de glicerol, o sorbitol, poloxámeros y polisorbatos. Por ejemplo, los tensioactivos ejemplares en las coformulaciones en el presente documento incluyen uno cualquiera o más de poloxamer 188 (PLURONICS®, tal como PLURONIC® F68), TETRONICS®, polisorbato 20, polisorbato 80, PEG 400, PEG 3000, Tween® (por ejemplo, Tween® 20 o Tween® 80), Triton® X-100, SPAN®, MYRJ®, BRIJ®, CREMOPHOR®, propilenglicoles o polietilenglicoles. En algunos ejemplos, las coformulaciones en el presente documento contienen poloxamer 188, polisorbato 20, polisorbato 80, generalmente poloxamer 188 (pluronic F68). Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen generalmente al menos un tensioactivo, tal como 1, 2 o 3 tensioactivos.

En las formulaciones proporcionadas en el presente documento, la cantidad total de los uno o más tensioactivos como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) en la formulación puede ser, por ejemplo, de entre o de entre aproximadamente del 0,0005 % al 1,0 %, tal como de entre o de entre aproximadamente del 0,0005 % al 0,005 %, del 0,001 % al 0,01 %, del 0,01 % al 0,5 %, tal como del 0,01 % al 0,1 % o del 0,01 % al 0,02 %. En general, las coformulaciones contienen al menos un 0,0005 %, 0,005 %; 0,05 % o 0,01 % de tensioactivo y contienen menos de un 1,0 %, tal como menos del 0,5 % o menos del 0,1 % de tensioactivo. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden contener un o aproximadamente un 0,0005 %, 0,0001 %; 0,005 %; 0,001 %; 0,005 %; 0,01 %; 0,015 %; 0,02 %; 0,025 %; 0,03 %; 0,035 %; 0,04 %; 0,045 %; 0,05 %; 0,055 %; 0,06 %; 0,065 %; 0,07 %; 0,08 %; o 0,09 % de tensioactivo. En ejemplos particulares, las

coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen o contienen aproximadamente un 0,01 % a un o aproximadamente un 0,05 % de tensioactivo.

5 Tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento, la estabilidad y la actividad enzimática de una enzima degradante de hialuronano (por ejemplo, rHuPH20) generalmente no se ve afectada entre diferentes tensioactivos o concentraciones de tensioactivo. Sin embargo, en el presente documento se observa que la oxidación de la enzima aumenta con niveles crecientes de tensioactivo. Asimismo, el tensioactivo poloxamer 188 provoca menos oxidación que los polisorbatos. De este modo, las coformulaciones en el presente documento contienen generalmente poloxamer 188. Por lo tanto, aunque los tensioactivos son capaces de estabilizar una enzima degradante de hialuronano, la inclusión de tensioactivos en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento puede dar como resultado la oxidación de la enzima degradante de hialuronano a altas concentraciones. Por lo tanto, generalmente se usan concentraciones menores de tensioactivo en las coformulaciones del presente documento, por ejemplo, como un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de menos del 1,0 % y generalmente de entre o aproximadamente entre el 0,0005 % al 0,1 %, tal como de entre o aproximadamente entre el 0,01 % o el 0,05 %. Asimismo, tal como se proporciona más adelante del presente documento, puede incluirse opcionalmente un agente antioxidante en la formulación para reducir o prevenir la oxidación.

20 Las coformulaciones ejemplares proporcionadas en el presente documento contienen poloxamer 188. El poloxamer 188 tiene una concentración crítica de micelas (cmc) mayor. Por lo tanto, el uso de poloxamer 188 puede reducir la formación de micelas en la formulación, lo que a su vez reduce la eficacia de los conservantes. Por lo tanto, entre las coformulaciones proporcionadas en el presente documento se encuentran aquellas que contienen o que contienen aproximadamente un 0,01 % o un 0,05 % de poloxamer 188.

25 En otros ejemplos, las coformulaciones ejemplares proporcionadas en el presente documento contienen polisorbato 20. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen del 0,0005 % al 0,1 %, tal como del 0,0005 % al 0,01 %, tal como al menos o aproximadamente al menos o el 0,001 % de polisorbato 20.

ii. Modificador de la tonicidad

30 Por ejemplo, pueden incluirse modificadores de la tonicidad en la formulación proporcionada en el presente documento para producir una solución con la osmolaridad deseada. Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento tienen una osmolaridad de entre o de aproximadamente entre 245 mOsm/kg a 305 mOsm/kg. Por ejemplo, la osmolaridad es de o de aproximadamente 245 mOsm/kg, 250 mOsm/kg, 255 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 265 mOsm/kg, 270 mOsm/kg, 275 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 285 mOsm/kg, 290 mOsm/kg, 295 mOsm/kg, 300 mOsm/kg o 305 mOsm/kg. En algunos ejemplos, las coformulaciones de una insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) tienen una osmolaridad de o de aproximadamente 275 mOsm/kg.

40 Los modificadores de la tonicidad incluyen, pero sin limitación, glicerina, NaCl, aminoácidos, polialcoholes, trehalosa, y otras sales y/o azúcares. Por ejemplo, puede incluirse NaCl en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento a una concentración de entre o de aproximadamente entre 0 mM a 200 mM, tal como generalmente de 30 mM a 100 mM, 50 mM a 160 mM, por ejemplo, de 50 mM a 120 mM o de 80 mM a 140 mM, o de 50 mM a 200 mM. Típicamente, cuando se usa como modificador de la tonicidad, por ejemplo, en las coformulaciones que contienen Lys-Lys, se proporciona NaCl en una concentración menor de 140 mM, y generalmente menor de 130 mM, 120 mM, 110 mM, 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM o menos. La cantidad particular puede determinarse empíricamente para retener la actividad enzimática, la solubilidad de insulina y/o la tonicidad.

50 iii. Glicerina

En otros casos, se incluye glicerina (glicerol) en las coformulaciones. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen típicamente menos de 60 mM de glicerina, tal como menos de 55 mM, menos de 50 mM, menos de 45 mM, menos de 40 mM, menos de 35 mM, menos de 30 mM, menos de 25 mM, menos de 20 mM, menos de 15 mM, 10 mM o menos. La cantidad de glicerina depende típicamente de la cantidad de NaCl presente: cuando más NaCl esté presente en la formulación, se necesitará menos glicerina para lograr la osmolaridad deseada. Por lo tanto, por ejemplo, en las coformulaciones que contienen mayores concentraciones de NaCl, tales como aquellas formuladas con insulinas con una mayor solubilidad aparente (por ejemplo, insulina glulisina), se necesita incluir poca o nada de glicerina en la formulación. Por el contrario, en las coformulaciones que contienen concentraciones ligeramente menores de NaCl, tales como aquellas formuladas con insulinas con menor solubilidad aparente (por ejemplo, insulina aspart), puede incluirse glicerina. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que contienen insulina aspart contienen glicerina a una concentración menor de 50 mM, tal como de 20 mM a 50 mM, por ejemplo de o aproximadamente de 50 mM. En las coformulaciones que contienen una concentración incluso menor de NaCl, tales como aquellas formuladas con insulinas con la menor solubilidad aparente (por ejemplo, insulina lispro o insulina regular), se incluye glicerina a una concentración de o de aproximadamente, por ejemplo, 40 mM a 60 mM.

iv. Antioxidantes

Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden contener también antioxidantes para reducir o prevenir la oxidación, en particular, oxidación de la enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, los ejemplos en el presente documento muestran que la oxidación puede efectuarse mediante altas concentraciones de tensoactivo u oligómeros de hialuronano. Los antioxidantes ejemplares incluyen, pero sin limitación, cisteína, triptófano y metionina. En ejemplos particulares, el antioxidante es metionina. Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que contienen una insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) pueden incluir un antioxidante a una concentración de entre o desde aproximadamente entre 5 mM a o a aproximadamente 50 mM, tal como de 5 mM a 40 mM, 5 mM a 20 mM o 10 mM a 20 mM. Por ejemplo, puede proporcionarse metionina en las coformulaciones en el presente documento a una concentración de entre o desde aproximadamente entre 5 mM a o a aproximadamente 50 mM, tal como de 5 mM a 40 mM, 5 mM a 20 mM o 10 mM a 20 mM. Por ejemplo, un antioxidante, por ejemplo metionina, puede incluirse a una concentración que es o es de aproximadamente 5 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM. En algunos ejemplos, las coformulaciones contienen 10 mM a 20 mM de metionina, tales como de o de aproximadamente 10 mM a 20 mM de metionina.

v. Cinc

En algunos casos, se incluye cinc en las coformulaciones como estabilizante para los hexámeros de insulina. Por ejemplo, las formulaciones que contienen insulina regular, insulina lispro o insulina aspart contienen típicamente cinc, mientras que las formulaciones que contienen insulina glulisina no contienen cinc. El cinc puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de óxido de cinc, acetato de cinc o cloruro de cinc. El cinc puede estar presente en una composición proporcionada en el presente documento a entre o aproximadamente entre 0,001 a 0,1 mg por 100 unidades de insulina (mg/100 U), 0,001 a 0,05 mg por 100 U o 0,01 a 0,05 mg por 100 U. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden contener cinc a o a aproximadamente 0,002 miligramos por 100 unidades de insulina (mg/100 U), 0,005 mg/100 U, 0,01 mg/100 U, 0,012 mg/100 U, 0,014 mg/100 U, 0,016 mg/100 U, 0,017 mg/100 U, 0,018 mg/100 U, 0,02 mg/100 U, 0,022 mg/100 U, 0,024 mg/100 U, 0,026 mg/100 U, 0,028 mg/100 U, 0,03 mg/100 U, 0,04 mg/100 U, 0,05 mg/100 U, 0,06 mg/100 U, 0,07 mg/100 U, 0,08 mg/100 U o 0,1 mg/100 U.

vi. Estabilizador de aminoácidos

La coformulación proporcionada en el presente documento también puede contener un estabilizante de aminoácidos, lo que contribuye a la estabilidad de la preparación. El estabilizante puede ser un aminoácido no polar y básico. Los aminoácidos no polares y básicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, la alanina, histidina, arginina, lisina, ornitina, isoleucina, valina, metionina, glicina y prolina. Por ejemplo, el estabilizante de aminoácidos es glicina o prolina, típicamente glicina. El estabilizante puede ser un solo aminoácido o puede ser una combinación de 2 o más de estos aminoácidos. Los estabilizantes de aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales, análogos de aminoácidos, modificadores de aminoácidos o equivalentes de aminoácidos. En general, el aminoácido es un L-aminoácido. Por ejemplo, en los casos donde se usa prolina como estabilizante, es generalmente L-prolina. También es posible usar equivalentes de aminoácidos, por ejemplo, análogos de prolina. La concentración de estabilizante de aminoácidos, por ejemplo, glicina, incluida en la coformulación varía de 0,1 M a 1 M de aminoácido, típicamente de 0,1 M a 0,75 M, generalmente de 0,2 M a 0,5 M, por ejemplo, al menos o aproximadamente 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M, 0,45 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M, 0,75 M o más. El aminoácido, por ejemplo, glicina, puede usarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, acetato, etc. La pureza del aminoácido, por ejemplo, glicina, debe ser de al menos el 98 %, al menos el 99 %, o al menos el 99,5 % o más.

vii. Inhibidor de hialuronidasa

En algunos ejemplos de las coformulaciones proporcionadas en el presente documento, la estabilidad de una enzima degradante de hialuronano y una insulina de acción rápida a una temperatura de desde o aproximadamente 20 °C a o a aproximadamente 30 °C durante al menos 14 días (es decir, 2 semanas) tal como se describe en el presente documento puede aumentarse incluyendo un inhibidor de hialuronidasa. Dicho inhibidor no es generalmente adecuado para las formulaciones almacenadas a 2 °C a 8 °C, ya que, tal como se ha observado con el hialuronano (HA) en el presente documento, puede hacer que la insulina se agregue a menores temperaturas. En algunos ejemplos, puede seleccionarse un inhibidor de hialuronidasa que sea adecuada para su uso de 2 °C a 8 °C.

En particular, en una coformulación se incluyen inhibidores de hialuronidasa para estabilizar la enzima degradante de hialuronano frente a los efectos de los conservantes fenólicos. En ejemplos particulares, el inhibidor de hialuronidasa es uno que reacciona con la insulina o la enzima degradante de hialuronano de una manera asociativa y no covalente, y no forma complejos covalentes con la insulina o una enzima degradante de hialuronano. El inhibidor de hialuronidasa se proporciona a al menos su concentración de equilibrio. Un experto en la materia está familiarizado con diversas clases de inhibidores de hialuronidasa (véase, por ejemplo, Girish et al. (2009) Current

Medicinal Chemistry, 16:2261-2288, y las referencias citadas en el mismo). Un experto en la materia sabe o puede determinar mediante métodos convencionales en la técnica la concentración de equilibrio de un inhibidor de hialuronidasa en una reacción o composición estable en el presente documento. La selección de inhibidor de hialuronidasa dependerá de la enzima degradante de hialuronano particular usada en la composición. Por ejemplo, el hialuronano es un inhibidor de hialuronidasa ejemplar para su uso en las composiciones estables en el presente documento cuando la enzima degradante de hialuronano es una PH20.

Los inhibidores de hialuronidasa ejemplares para su uso como agentes estabilizantes en el presente documento incluyen, pero sin limitación, una proteína, glucosaminoglucano (GAG), polisacáridos, ácidos grasos, lanostanoides, antibióticos, anti-nematodos, compuestos orgánicos sintéticos o un componente bioactivo de origen vegetal. Por ejemplo, un componente bioactivo derivado de plantas de hialuronidasa puede ser un alcaloide, antioxidante, polifenol, flavonoide, terpenoides y fármacos antiinflamatorios. Los ejemplos de inhibidores de hialuronidasa incluyen, por ejemplo, inhibidor de hialuronidasa sérica, glucoproteína de *Withania somnifera* (WSG), heparina, sulfato de heparina, sulfato de dermatano, quitosanos, β -(1,4)-galacto-oligosacáridos, verbascosa sulfatada, planteosa sulfatada, pectina, poli(estireno-4-sulfonato), sulfato de dextrano, alginato de sodio, polisacárido de *Undaria pinnatifida*, polímero de condensación de ácido mandélico, ácido eicosatrienoico, ácido nervónico, ácido oleanólico, ácido aristolócico, ajmalina, reserpina, flavona, desmetoxicentauredina, quercetina, apigenina, kaempferol, silibina, luteolina, luteolin-7-glucósido, floretina, apiína, hesperidina, hesperidina sulfonatada, calcosin-7-O- β -D-glucopiranosido, flavona-7-sulfato de sodio, flavona 7-fluoro-4'-hidroxiflavona, 4'-cloro-4,6-dimetoxicalcona, 5-hidroxiflavona 7-sulfato de sodio, miricetina, rutina, morina, glicirricina, vitamina C, ácido D-isoascórbico, 1,4-lactona D-sacárica, 6-hexadecanoato de ácido L-ascórbico (Vcpal), vitamina C 6-O-acilada, catequina, ácido nordihidroguaiarético, curcumina, galato de N-propilo, ácido tánico, ácido elágico, ácido gálico, fluorofucofuroecol A, diecol, 8,8'-biecol, procianidina, gossipol, celecoxib, nimesulida, dexametasona, indometacina, fenoprofeno, fenilbutazona, oxifenbutazona, salicilatos, cromoglicato disódico, aurotiomalato de sodio, transilist, traxanox, ivermectina, lincomicina y espectinomocina, sulfametoxazol y trimetoprima, sulfato de neomicina, ácido 3 α -acetilpoliporénico A, ácido (25S)-(+)-12 α -hidroxi-3 α -metilcarboxiacetato-24-metilnosta-8,24(31)-dien-26-oico, lanostanoide, ácido poliporénico C, PS53 (polímero de hidroquinona-ácido sulfónico-formaldehído), polímero de poli(estireno-4-sulfonato), VERSA-TL 502, ácido 1-tetradecano sulfónico, polímero de condensación de ácido mandélico (SAMMA), 1,3-diacetilbencimidazol-2-tiona, bencimidazol-2-tiona N-monoacilada, bencimidazol-2-tiona N,N'-diacilada, derivado de alquil-2-fenilindol, 3-propanoilbenzoxazol-2-tiona, derivado de indol N-alquilado, derivado de indol N-acilado, derivado de benzotiazol, derivados de indol-2- y 3-carboxamida N-sustituidos, análogos halogenados (cloro y flúor) de derivados de indol-2- y 3-carboxamida N-sustituidos, 2-(4-hidroxifenil)-3-fenilindol, carboxamidas de indol, acetamidas de indol, 3-benzolil-1-metil-4-fenil-4-piperidinol, derivado de benzoato de fenil benzoilo, derivado de 1-arginina, HCL guanidinio, L-NAME, HCN, linamarina, amigdalina, hederagenina, aescina, CIS-hinokiresinol y 1,3-di-p-hidroxifenil-4-penten-1-ona.

En algunos ejemplos, el agente estabilizante que es un inhibidor de hialuronidasa es un polisacárido de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. En otro ejemplo, el agente estabilizante que es un inhibidor de hialuronidasa es un azúcar de amina con un azúcar cargado negativamente. En ejemplos adicionales, el agente estabilizante que es un inhibidor de hialuronidasa es un aminometil indol o un derivado de ácido ascórbico.

Las coformulaciones ejemplares proporcionadas en el presente documento contienen un agente estabilizante que es hialuronano (ácido hialurónico; HA). El ácido hialurónico (HA), también conocido como hialuronano e hialuronato) es el sustrato natural para las enzimas degradantes de hialuronano, tales como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20, incluyendo rHuPH20. El HA es un glucosaminoglucano no sulfatado que está ampliamente distribuido en los tejidos conectivo, epitelial, y neural. Es un polímero de hasta 25.000 unidades de disacárido, compuestas en sí de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina. El peso molecular de HA varía desde aproximadamente 5 kDa a 200.000 kDa. Al catalizar la hidrólisis del hialuronano, rHuPH20 (y otras hialuronidasas y enzimas degradantes de hialuronano) reducen la viscosidad del hialuronano, aumentando de este modo la permeabilidad tisular y aumentando la velocidad de absorción de fluidos administrados por vía parenteral.

Tal como se demuestra en el presente documento, es ácido hialurónico (HA) es un estabilizante eficaz de las enzimas degradantes de hialuronano en presencia de agentes y condiciones de otro modo desestabilizantes, tales como, por ejemplo, baja salinidad, alto pH, la presencia de conservantes y temperaturas elevadas. En particular, El HA parece reducir o negar el efecto negativo que tiene el alto pH y/o las temperaturas elevadas típicamente en rHuPH20 y otras hialuronidasas solubles y enzimas degradantes de hialuronano, particularmente en presencia de conservantes fenólicos. Por ejemplo, tal como se muestra en los estudios descritos más adelante (véase, por ejemplo, el ejemplo 10D y el ejemplo 15), la estabilidad de rHuPH20 aumenta significativamente cuando los oligómeros de HA (4-16 meros) se incluyen en las coformulaciones con insulina. Las concentraciones en aumento de HA tienen mayores propiedades estabilizantes. Por ejemplo, tras 1 semana a 30 °C a pH 7,1 con 1 mg/ml de HA y 75 mM de NaCl, la actividad de la rHuPH20 en la coformulación de rHuPH20/insulina se redujo de 600 U/ml a 341 U/ml (es decir, retuvo un 57 % de la actividad original). Cuando se aumentó la concentración de HA a 10 mg/ml, la actividad de la rHuPH20 se redujo de 600 U/ml a 510 U/ml (es decir, retuvo un 85 % de la actividad original). Además, el HA reduce o niega el efecto desestabilizante que un alto pH tiene en rHuPH20. Por ejemplo, tras 1 semana a 30 °C a pH 7,1 con 5,5 mg/ml de HA y 100 mM de NaCl, permaneció un 68 % de la rHuPH20 original. Este porcentaje permaneció esencialmente sin cambios cuando se aumentó el pH a 7,5. Se observó un impacto

positivo similar del HA en la rHuPH20 a temperaturas elevadas (véase, por ejemplo, el ejemplo 15). Por lo tanto, en el presente documento se determina que puede incluirse HA en formulaciones de insulina y rHuPH20 (u otras hialuronidasas y enzimas degradantes de hialuronano) para estabilizar de manera eficaz a rHuPH20.

5 Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan coformulaciones que contienen HA. Puede usarse cualquier tamaño de HA en las composiciones como estabilizante. En algunos ejemplos, el HA es un disacárido, compuesto de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina. En otros ejemplos, el HA es un oligosacárido, tal como un tetrasacárido, que contiene 2 unidades de disacárido repetidas, o como alternativa, el HA usado en las
10 coformulaciones proporcionadas en el presente documento puede contener múltiples unidades de disacárido repetidas, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más unidades de disacárido. En otro ejemplo, el HA usado en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento tiene un peso molecular que es desde o desde aproximadamente 5 kDa a o a aproximadamente 5.000 kDa; desde o desde aproximadamente 5 kDa a o a aproximadamente 1.000 kDa; desde o desde aproximadamente 5 kDa a o a aproximadamente 500 kDa; o desde o desde aproximadamente 5 kDa a o a aproximadamente 200 kDa. Los oligosacáridos de HA ejemplares para su uso en las coformulaciones en el presente documento tienen un peso
15 molecular de o de aproximadamente 6,4 kDa, 74,0 kDa o 234,4 kDa. Por ejemplo, se incluyen entre las composiciones proporcionadas en el presente documento de insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa (por ejemplo, rHuPH20), aquellas que contienen HA que tiene un peso molecular de al menos o de aproximadamente 5 kDa, 6 kDa, 7 kDa, 8 kDa, 9 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa,
20 60 kDa, 70 kDa, 80 kDa, 90 kDa, 100 kDa, 120 kDa, 140 kDa, 160 kDa, 180 kDa, 200 kDa, 220 kDa, 240 kDa, 260 kDa, 280 kDa, 300 kDa, 350 kDa, 400 kDa, 450 kDa, o 500 kDa. En un ejemplo, el peso molecular del HA en la coformulación es de menos de 10 kDa.

En el presente documento se proporcionan, por lo tanto, coformulaciones de insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) que contienen un oligosacárido de HA. Las coformulaciones contienen de 1 mg/ml a 20 mg/ml de HA, tal como al menos o aproximadamente 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml o 20 mg/ml o más de HA. Las coformulaciones estables ejemplares de insulina y rHuPH20 incluyen desde o desde aproximadamente 8 mg/ml
30 a o a aproximadamente 12 mg/ml de HA, tal como, por ejemplo, 10 mg/ml o aproximadamente 10 mg/ml. En algunos ejemplos, la relación molar de HA a enzima degradante de hialuronano es o es de aproximadamente 100.000:1, 95.000:1, 90.000:1, 85.000:1, 80.000:1, 75.000:1, 70.000:1, 65.000:1, 60.000:1, 55.000:1, 50.000:1, 45.000:1, 40.000:1, 35.000:1, 30.000:1, 25.000:1, 20.000:1, 15.000:1, 10.000:1, 5.000:1, 1.000:1, 900:1, 800:1, 700:1, 600:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, o 100:1 o menor.

35 **viii. Compuesto nicotínico**

En algunos ejemplos, se usa un compuesto nicotínico como agente estabilizante. Los compuestos nicotínicos incluyen, pero sin limitación, nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida, vitamina B3 y/o sales de los
40 mismos y/o cualquier combinación de los mismos. En aplicaciones particulares, el agente estabilizante puede incluir un compuesto nicotínico y un aminoácido o aminoácidos (véase, por ejemplo, la Solicitud PCT publicada n.º WO2010149772). Por ejemplo, el aminoácido puede ser arginina, ácido glutámico y/o sales de los mismos o combinaciones de los mismos.

45 **ix. Otros excipientes o agentes**

Opcionalmente, las coformulaciones pueden incluir vehículos, tales como un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la coformulación. Los ejemplos adecuados de vehículos farmacéuticos se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una
50 cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada o en forma parcialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para su administración adecuada al paciente. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos cuyo origen es petróleo, animal, vegetal u origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, y aceite de sésamo. El agua es un vehículo típico cuando la composición farmacéutica se
55 administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables.

Por ejemplo, los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en las preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes,
60 anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de dextrosa y Ringer lactado. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites no volátiles de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Pueden añadirse agentes
65 antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a las preparaciones parenterales envasadas en envases multidosis, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres del 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 clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen

5 Polisorbato 80 (Tween 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste del pH.

Las composiciones pueden contener junto con un principio activo: un diluyente, tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; un aglutinante, tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábiga, gelatina, glucosa, melaza, polivinilpirrolidona, celulosas y derivados de las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes similares conocidos para los expertos en la materia.

15 Por ejemplo, puede añadirse un excipiente de proteína a la coformulación que puede ser cualquiera de una serie de proteínas o péptidos farmacéuticamente aceptables. En general, el excipiente de proteínas se selecciona respecto de su capacidad para administrarse a un sujeto mamífero sin provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la albúmina de suero humana es adecuada para su uso en formulaciones farmacéuticas. Otros excipientes de proteínas farmacéuticas conocidos incluyen, pero sin limitación, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta,

20 arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propileno, glicoles, agua, y etanol. El excipiente se incluye en la formulación a una concentración suficiente para prevenir la adsorción de la proteína al vaso o vial contenedor. La concentración del excipiente variará de acuerdo con la naturaleza del excipiente y de la concentración de la proteína en la coformulación.

25 Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de sodio de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros agentes similares.

30 2. Coformulaciones estables ejemplares

a. Coformulaciones de inyección multidosis (MDI) ejemplares

En el presente documento se proporcionan coformulaciones estables de una insulina de acción rápida, tal como un análogo de insulina de acción rápida (de rápida acción), y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) que son estables durante al menos 6 meses a una temperatura desde o desde aproximadamente 2 °C hasta o hasta aproximadamente 8 °C y durante al menos 14 días (es decir, 2 semanas) a una temperatura de desde o de aproximadamente 20 °C hasta o hasta aproximadamente 30 °C. Los ejemplos de las coformulaciones para MDI son aquellas que son estables durante al menos 6, 7, 8, 9, 10,

40 15, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60 o más meses a una temperatura de desde o desde aproximadamente 2 °C hasta o hasta aproximadamente 8 °C, y durante al menos o aproximadamente 14, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 40, 45 o 50 o más días a una temperatura de desde o de aproximadamente 20 °C hasta o hasta aproximadamente 30 °C.

Por ejemplo, las formulaciones proporcionadas en el presente documento son estables a o a aproximadamente 2-8 °C durante al menos un año, por ejemplo, al menos 12 meses, 13 meses, 14 meses, 15 meses, 16 meses, 17 meses, 18 meses, 19 meses, 20 meses, 21 meses, 22 meses, 23 meses, 24 meses, 25 meses, 26 meses, 27 meses, 28 meses, 29 meses, 30 meses, 31 meses, 32 meses, 33 meses, 34 meses, 35 meses, 36 meses o más. En particular, las formulaciones proporcionadas en el presente documento son estables a o a aproximadamente 2-8 °C durante al menos 24 meses.

En otros ejemplos, las formulaciones proporcionadas en el presente documento son estables durante al menos una semana a o a aproximadamente 20-30 °C, tal como al menos o aproximadamente 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C o 30 °C, durante al menos una semana. Por ejemplo, las formulaciones proporcionadas en el presente documento son estables a o a aproximadamente 20-30 °C durante al menos 7 días, 8 días, 9 días, 10 días,

55 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, un mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más. En particular, las formulaciones proporcionadas en el presente documento son estables a o a aproximadamente 20-30 °C, tal como a o a aproximadamente 25 °C o 30 °C durante al menos un mes.

En algunos ejemplos, una coformulación estable proporcionada en el presente documento contiene de 100 U/ml a 1000 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), y en particular a o a aproximadamente o al menos 600 U/ml; 10 U/ml a 1000 U/ml de una insulina de acción rápida, y en particular de al menos o aproximadamente 100 U/ml; NaCl a una concentración entre o de aproximadamente entre 50 mM a 200 mM; un pH de entre o aproximadamente entre 6,8 a 7,8, tal como de entre o aproximadamente entre 7,0 a 7,6; un agente tamponador que mantiene el intervalo de pH entre o aproximadamente entre 6,8 a 7,8 o 7,0 a 7,6; y una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante o una

mezcla de conservantes del 0,1 % al 0,4 % de conservante como concentración en masa (p/v); y un agente estabilizante en una cantidad que, a lo largo de la duración del almacenamiento (temperatura y tiempo), se retiene al menos un 50 % de la actividad inicial de enzima degradante de hialuronano, tal como al menos o aproximadamente al menos 375 U/ml de actividad de enzima degradante de hialuronano. Con respecto al agente tamponador, puede usarse cualquier agente tamponador que pueda incluirse en una cantidad para mantener el intervalo de pH de la coformulación entre o aproximadamente entre 6,8 a 7,8, tal como entre o aproximadamente entre 7,0 a 7,6. Típicamente, en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento se incluye Tris a una concentración de o de aproximadamente 10 mM a 50 mM, tales como, por ejemplo, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM. En ejemplos particulares, las coformulaciones contienen o contienen aproximadamente de 20 mM a 20 mM de Tris, tal como de 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM o 30 mM de Tris. En ejemplos particulares, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen Tris a una concentración de o de aproximadamente 30 mM.

Por ejemplo, los ejemplos de dichas formulaciones contienen de 100 U/ml a 1000 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), y en particular a o a aproximadamente o al menos 600 U/ml; 10 U/ml a 1000 U/ml de una insulina de acción rápida, y en particular de al menos o aproximadamente 100 U/ml; NaCl a una concentración de entre o de aproximadamente entre 80-140 mM; un pH de entre o aproximadamente entre 7,0 a 7,6; un agente tamponador que mantiene el intervalo de pH entre o aproximadamente entre 7,0 a 7,6; del 0,1 % al 0,4 % de conservante como concentración en masa (p/v); y un agente estabilizante en una cantidad que, a lo largo de la duración del almacenamiento (temperatura y tiempo), se retiene al menos un 50 % de la actividad inicial de enzima degradante de hialuronano, tal como al menos o aproximadamente al menos 375 U/ml de actividad de enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen de 1 mM a 100 mM de un agente tamponador (por ejemplo, Tris). Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen del 0,01 % al 0,5 % de tensioactivo. Las coformulaciones ejemplares proporcionadas en el presente documento también pueden contener menos de 60 mM de glicerina (glicerol) y de 5 mM a o a aproximadamente 50 mM de un antioxidante.

Las siguientes formulaciones estables son solo ejemplares y proporcionan una plataforma a partir de la cual pueden efectuarse ajustes menores. Se entiende que pueden efectuarse cambios muy pequeños en las concentraciones de los diversos excipientes y otros componentes (por ejemplo, \pm 15 % de las concentraciones indicadas), o pequeños cambios en el pH, a la vez que se retienen una parte si no la totalidad de la solubilidad y estabilidad de la insulina y de la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano. También pueden efectuarse cambios adicionales añadiendo o eliminando excipientes. Por ejemplo, puede cambiarse el tipo de tensioactivo estabilizante. Por ejemplo, las coformulaciones ejemplares en el presente documento contienen de 100 U/ml a 1000 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), y en particular al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 600 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20); 10 U/ml a 1000 U/ml de una insulina de acción rápida, y en particular al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 100 U/ml de una insulina de acción rápida; desde o desde aproximadamente 10 mM a o a aproximadamente 50 mM de Tris (por ejemplo, desde o desde aproximadamente 20 mM a 40 mM de Tris, tal como al menos o aproximadamente al menos 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM o 40 mM); desde o desde aproximadamente 80 mM a o a aproximadamente 140 mM de NaCl (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM o 160 mM de NaCl); desde o desde aproximadamente 5 mM a o a aproximadamente 50 mM de metionina (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM de metionina); desde o desde aproximadamente 0 mM a o a aproximadamente 50 mM de glicerina (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM de glicerina); desde o desde aproximadamente un 0,01 % a o a aproximadamente un 0,5 % de poloxamer 188, tal como de un 0,01 % a un 0,05 % (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos un 0,01 %, 0,02 %; 0,03 %; 0,04 % o 0,05 % de poloxamer 188); desde o desde aproximadamente un 0,1 % a o a aproximadamente un 0,25 % de fenol (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos un 0,1 %, 0,12 %; 0,125 %; 0,13 %; 0,14 %; 0,15 %; 0,16 % o 0,17 % de fenol); y desde o desde aproximadamente un 0,05 % a o a aproximadamente un 0,2 % de m-cresol (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos un 0,075 %, 0,08 %; 0,09 %; 0,1 %; 0,12 %; 0,13 %; 0,14 %; 0,15 %; 0,16 % o 0,17 % de m-cresol). Las formulaciones se preparan con un pH desde o desde aproximadamente 7,0 a o a aproximadamente 7,6 (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6). En ejemplos adicionales, se incluye cinc a una concentración de o de aproximadamente 0,017 mg/100 U, 0,018 mg/100 U, 0,02 mg/100 U, 0,022 mg/100 U o 0,024 mg/100 U de insulina.

Tal como se discute anteriormente, las concentraciones de los diversos componentes en las formulaciones pueden aumentarse o reducirse dependiendo de las propiedades particulares de la insulina. Por ejemplo, las formulaciones de insulinas con mayor solubilidad aparente, tales como insulina aspart, contienen típicamente una concentración mayor de NaCl y una concentración menor de glicerina en comparación con las formulaciones de insulinas con menor solubilidad aparente, tales como insulina lispro. Dependiendo de la concentración de NaCl, también puede variar el pH de la formulación entre diferentes insulinas.

Por ejemplo, entre las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento se incluyen coformulaciones estables de una insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por

ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) que contiene entre o aproximadamente entre 50 a 120 mM NaCl, por ejemplo, de 50 mM a 100 mM, tales como 50 mM a 90 mM o 80 mM a 100 mM. Dichas coformulaciones incluyen aquellas que contienen el análogo de insulina, insulina lispro. En otros ejemplos, las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento incluyen coformulaciones estables de una insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) que contiene entre o aproximadamente entre 80 mM a 160 mM de NaCl, tales como de 100 mM a 140 mM, por ejemplo, 120 mM. Dichas coformulaciones incluyen aquellas que contienen insulina aspart. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan coformulaciones de rHuPH20 e insulina aspart o insulina lispro que contienen o que contienen aproximadamente 80 mM o 100 mM de NaCl.

En otro ejemplo, entre las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento se incluyen coformulaciones estables de una insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) que contiene entre o aproximadamente entre 80 mM a 200 mM, por ejemplo, 100 mM a 150 mM, tal como de 130 mM a 150 mM, 120 mM a 140 mM o 110 mM a 130 mM. Dichas coformulaciones incluyen aquellas que contienen el análogo de insulina glulisina. En algunos ejemplos, las coformulaciones que contienen, por ejemplo, insulina glulisina, tienen una concentración de sal (NaCl) de o de aproximadamente 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 121 mM, 122 mM, 123 mM, 124 mM, 125 mM, 126 mM, 127 mM, 128 mM, 129 mM, 130 mM, 131 mM, 132 mM, 133 mM, 134 mM, 135 mM, 136 mM, 137 mM, 138 mM, 139 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM o 200 mM. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan coformulaciones de rHuPH20 e insulina glulisina que contienen o que contienen aproximadamente 120 mM o 140 mM de NaCl.

En los ejemplos de coformulaciones proporcionadas en el presente documento se encuentran coformulaciones de una insulina, tales como insulina aspart, y rHuPH20 que tienen un pH de o de aproximadamente 7,2, por ejemplo, $7,2 \pm 0,2$. En otros ejemplos, las coformulaciones de una insulina, tal como insulina lispro, y rHuPH20 tienen un pH de o de aproximadamente 7,4, por ejemplo, $7,4 \pm 0,2$. En ejemplos adicionales, las coformulaciones de una insulina, tal como insulina glulisina, y rHuPH20 tienen un pH de o de aproximadamente 7,3 o 7,4, por ejemplo, $7,3 \pm 0,2$ o $7,4 \pm 0,2$.

Los ejemplos de las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que contienen una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), e insulina lispro son aquellas que contienen desde o aproximadamente 25 mM a o a aproximadamente 35 mM de Tris (por ejemplo, de o de aproximadamente 30 mM); desde o desde aproximadamente 70 mM a o a aproximadamente 100 mM de NaCl (por ejemplo, a o a aproximadamente 80 mM o 100 mM de NaCl); desde o desde aproximadamente 10 mM a o a aproximadamente 30 mM de metionina (por ejemplo, a o a aproximadamente 10 mM o 20 mM de metionina); desde o desde aproximadamente 40 mM a o a aproximadamente 60 mM de glicerina (por ejemplo, a o a aproximadamente 50 mM de glicerina); desde o desde aproximadamente un 0,005 % a o a aproximadamente un 0,05 % de poloxamer 188 (por ejemplo, a o a aproximadamente un 0,01 % de poloxamer 188); desde o desde aproximadamente 0,017 mg de cinc/100 U de insulina a o a aproximadamente 0,024 mg de cinc/100 U de insulina (por ejemplo, 0,017 mg de cinc/100 U de insulina, 0,018 mg/100 U, 0,02 mg/100 U, 0,022 mg/100 U o 0,024 mg de cinc/100 U de insulina); desde o desde aproximadamente un 0,08 % a o a aproximadamente un 0,17 % de fenol (por ejemplo, un 0,1 %, 0,125 % o 0,13 % de fenol); y desde o desde aproximadamente un 0,07 % a o a aproximadamente un 0,17 % de m-cresol (por ejemplo, un 0,075 %, 0,08 %, 0,13 % o 0,15 % de m-cresol). Por ejemplo, las coformulaciones pueden contener un o aproximadamente un 0,1 % de fenol y un 0,015 % de m-cresol; un o aproximadamente un 0,125 % de fenol y un 0,075 % de m-cresol; un o aproximadamente un 0,13 % de fenol y un 0,075 % de m-cresol; un o aproximadamente un 0,13 % de fenol y un 0,08 % de m-cresol; o un o aproximadamente un 0,17 % de fenol y un 0,13 % de m-cresol. Dichas coformulaciones de insulina lispro y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa soluble (por ejemplo, rHuPH20), se preparan con un pH de o de aproximadamente 7,0 a o a aproximadamente 7,5 (típicamente un pH de o de aproximadamente pH 7,2).

Los ejemplos de las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que contienen una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), e insulina aspart son aquellas que contienen desde o desde aproximadamente 25 mM a o a aproximadamente 35 mM de Tris (por ejemplo, de o de aproximadamente 30 mM); de o de aproximadamente 70 mM a o a aproximadamente 100 mM de NaCl (por ejemplo, a o a aproximadamente 80 mM o 100 mM de NaCl); desde o desde aproximadamente 10 mM a o a aproximadamente 30 mM de metionina (por ejemplo, a o a aproximadamente 10 mM o 20 mM de metionina); desde o desde aproximadamente 40 mM a o a aproximadamente 60 mM de glicerina (por ejemplo, a o a aproximadamente 50 mM de glicerina); desde o desde aproximadamente un 0,005 % a o a aproximadamente un 0,05 % de poloxamer 188 (por ejemplo, a o a aproximadamente un 0,01 % de poloxamer 188); desde o desde aproximadamente 0,017 mg de cinc/100 U de insulina a o a aproximadamente 0,024 mg de cinc/100 U de insulina (por ejemplo, 0,017 mg de cinc/100 U de insulina, 0,018 mg/100 U, 0,02 mg/100 U, 0,022 mg/100 U o 0,024 mg de cinc/100 U de insulina); desde o desde aproximadamente un 0,08 % a o a aproximadamente un 0,17 % de fenol (por ejemplo, un 0,1 %, 0,125 % o 0,13 % de fenol); y desde o desde aproximadamente un 0,07 % a o a aproximadamente un 0,17 % de m-cresol (por ejemplo, un 0,075 %, 0,08 %, 0,13 % o 0,15 % de m-cresol). Por ejemplo, las coformulaciones pueden contener un o aproximadamente un 0,1-1 % de fenol y un 0,015 % de m-cresol; un o aproximadamente un 0,125 % de fenol y un 0,075 % de m-cresol; un o aproximadamente un 0,13 % de

fenol y un 0,075 % de m-cresol; un o aproximadamente un 0,13 % de fenol y un 0,08 % de m-cresol; o un o aproximadamente un 0,17 % de fenol y un 0,13 % de m-cresol. Dichas coformulaciones de insulina aspart y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20) se preparan con un pH de o de aproximadamente 7,0 a o a aproximadamente 7,6 (típicamente un pH de o de aproximadamente pH 7,4).

Los ejemplos de las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que contienen una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), e insulina glulisina son aquellas que contienen desde o desde aproximadamente 25 mM a o a aproximadamente 35 mM de Tris (por ejemplo, de o de aproximadamente 30 mM); de o de aproximadamente 100 mM a o a aproximadamente 150 mM de NaCl. (por ejemplo, a o a aproximadamente 100 mM o 140 mM de NaCl); desde o desde aproximadamente 10 mM a o a aproximadamente 30 mM de metionina (por ejemplo, a o a aproximadamente 10 mM o 20 mM de metionina); desde o desde aproximadamente 40 mM a o a aproximadamente 60 mM de glicerina (por ejemplo, a o a aproximadamente 50 mM de glicerina); desde o desde aproximadamente un 0,005 % a o a aproximadamente un 0,05 % de poloxamer 188 (por ejemplo, a o a aproximadamente un 0,01 % de poloxamer 188); desde o desde aproximadamente un 0,08 % a o a aproximadamente un 0,17 % de fenol (por ejemplo, un 0,1 %, 0,125 % o 0,13 % de fenol); y desde o desde aproximadamente un 0,07 % a o a aproximadamente un 0,17 % de m-cresol (por ejemplo, un 0,075 %, 0,08 %, 0,13 % o 0,15 % de m-cresol). Por ejemplo, las coformulaciones pueden contener un o aproximadamente un 0,1 % de fenol y un 0,015 % de m-cresol; un o aproximadamente un 0,125 % de fenol y un 0,075 % de m-cresol; un o aproximadamente un 0,13 % de fenol y un 0,075 % de m-cresol; un o aproximadamente un 0,13 % de fenol y un 0,08 % de m-cresol; o un o aproximadamente un 0,17 % de fenol y un 0,13 % de m-cresol. Dichas coformulaciones de insulina glulisina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, (por ejemplo, rHuPH20) se preparan con un pH de o de aproximadamente 7,0 a o a aproximadamente 7,6 (típicamente un pH de o de aproximadamente pH 7,4).

b. Coformulaciones de infusión de insulina subcutánea continua (CSII) ejemplares

En el presente documento se proporcionan coformulaciones estables que son estables en presencia de condiciones aceleradas o de estrés, tales como temperaturas elevadas mayores de o aproximadamente mayores de 32°C, tales como de 35 °C a 40 °C, en particular mayor de o de aproximadamente o de 37 °C o 40 °C y/o condiciones de agitación durante al menos 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días o al menos 7 días, y generalmente al menos 3 horas o al menos 3 días. Estas coformulaciones estables son adecuadas para su administración mediante infusión de insulina subcutánea continua (CSII).

Tal como se discute anteriormente, la concentración, cantidad o nivel de componentes que confieren estabilidad a las coformulaciones en el presente documento durante al menos 6 meses a temperaturas de desde o desde aproximadamente 2 °C a o a aproximadamente 8 °C y durante al menos 14 días (es decir, 2 semanas) a una temperatura de desde o desde aproximadamente 20 °C a o a aproximadamente 30 °C generalmente no son suficientes para conferir estabilidad de la coformulación en condiciones de estrés a temperatura elevada. En general, dichas coformulaciones son estables en dichas condiciones de estrés (por ejemplo, temperatura elevada) durante menos de 24 horas, y generalmente menos de 8 horas, que pueden impedir sustancialmente su uso en aplicaciones multidosis en donde existen dichas condiciones. Por ejemplo, la terapia de CSII se asocia con la infusión continua de formulaciones mediante una bomba u otro dispositivo que se lleva puesto fuera o próximo al cuerpo durante 24 horas al día durante 2 a 3 días. La formulación o coformulación de insulina se inyecta a través de una aguja en la pared abdominal o el muslo, pudiéndose controlar esta inyección mediante una bomba programada de tal forma que la formulación o coformulación de insulina se infunde de manera continua. Por lo tanto, las coformulaciones usadas para terapia de CSII se someten a elevadas temperaturas corporales de al menos o aproximadamente o mayores de 37 °C y condiciones de agitación.

Por ejemplo, una enzima degradante de hialuronano es particularmente inestable a temperaturas elevadas mayores de 32 °C, y típicamente mayores de 37 °C o 40 °C. También se observa en el presente documento que aunque la insulina cristaliza a 2 °C a 8 °C a altas concentraciones de sal y bajo pH, no cristaliza a altas concentraciones de sal y bajo pH a temperaturas mayores de 32 °C a 40 °C. Por consiguiente, el requisito opuesto de alta concentración de sal y bajo pH requerido por las enzimas degradantes de hialuronano (por ejemplo, PH20) para mantener su estabilidad a altas temperaturas de 32 °C a 40 °C es más compatibles a altas temperaturas durante al menos un corto periodo de tiempo de al menos 3 días. Asimismo, las mismas formulaciones altas en sal y de bajo pH confieren una estabilidad similar entre los análogos de insulina, a pesar de las diferencias en la solubilidad aparente que afectan a la estabilidad de la insulina a menores temperaturas.

Las coformulaciones estables que son estables en condiciones de estrés, por ejemplo, para su uso en terapia de CSII, contienen generalmente los mismos componentes que otras coformulaciones proporcionadas en el presente documento. Dichas coformulaciones, sin embargo, difieren en tanto que las coformulaciones que son estables en condiciones de estrés contienen generalmente una mayor concentración de sal, un pH menor y/o la presencia de otros uno o más excipientes que estabilizan suficientemente a la enzima degradante de hialuronano y/o a la insulina generalmente durante al menos 2 a 3 días a temperaturas elevadas mayores que o aproximadamente iguales a 32°C, tales como de 35 °C a 40 °C, en particular mayores de o de aproximadamente o de 37 °C o 40 °C y/o

condiciones de agitación. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que son estables en condiciones de estrés de temperaturas elevadas o de agitación contienen generalmente un inhibidor de hialuronidasa, tal como un sustrato de hialuronidasa (por ejemplo, hialuronano) como excipiente.

5 En un ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que son estables en condiciones de estrés de temperaturas elevadas o de agitación contienen una concentración de sal mayor y un pH menor que las coformulaciones proporcionadas anteriormente en la sección E.1.a. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan coformulaciones que son estables en condiciones de estrés (por ejemplo, temperatura elevada de 32 °C a 40 °C o agitación) durante al menos 3 días o 3 horas que contienen 120 mM de NaCl a 200 mM de NaCl y un
10 pH de 6,5 a 7,5. Tal como se ha discutido anteriormente, sin embargo, la solubilidad de la insulina, particularmente a temperaturas refrigeradas, disminuye en estas condiciones de pH reducido y sal aumentada. Por lo tanto, dichas formulaciones no se almacenan típicamente a temperaturas refrigeradas o ambientales antes de su uso.

15 En otro ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que son estables en condiciones de estrés de temperaturas elevadas (por ejemplo, de 32 °C a 40 °C) durante al menos 3 días o agitación durante al menos 3 horas contienen un inhibidor de hialuronidasa para estabilizar a la enzima degradante de hialuronano en la coformulación. Puede usarse cualquiera de los inhibidores de hialuronidasa descritos anteriormente en una coformulación del presente documento que es estable en condiciones de estrés de temperaturas elevadas (por ejemplo, de 32 °C a 40 °C) durante al menos 3 días o de agitación durante al menos 3 horas. En ejemplos
20 particulares, el inhibidor de hialuronidasa es un sustrato de hialuronidasa, por ejemplo, un hialuronano.

Tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento con el inhibidor de hialuronidasa, hialuronano, la presencia de un inhibidor de hialuronidasa estabiliza la actividad de PH20, particularmente en presencia de conservantes, especialmente a elevadas temperaturas, tales como condiciones de estrés de temperaturas de 32 °C
25 a 40 °C. Ya que los oligómeros de HA son la sustancia/producto de la reacción enzimática de una enzima degradante de hialuronano con hialuronano, los oligómeros de hialuronano pueden unirse al sitio activo de la enzima y causar el efecto estabilizante. Sin embargo, también se observa que con el paso del tiempo en condiciones de estrés de temperaturas elevadas de 32 °C a 40 °C, tales como de más de 1 semana o 2 semanas a 37 °C, la presencia de un inhibidor de hialuronidasa, tal como HA, en la coformulación puede dar como resultado la degradación de la insulina, dando como resultado de este modo aductos de HA-análogo de insulina. Por ejemplo, la
30 presencia de altas concentraciones de HA en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento se ha demostrado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) que causa degradación de la insulina Aspart® después de 1 semana a 37 °C y de insulina Glulisine® después de 2 semanas a 30 °C. El análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) indicó que parte de los productos de degradación son aductos de glucación de HA-análogo de insulina covalentes formados mediante la reacción de
35 insulina con el extremo reductor del HA. Por ejemplo, se determinó que un pico era el producto de la insulina Aspart® y un 7mero de HA mientras que otro pico era el producto de insulina Aspart® y un 2mero de HA.

40 La presencia de un inhibidor de hialuronidasa, tal como HA, también puede tener efectos en la precipitación y cambio de color de la coformulación. De este modo, mientras que el HA mejora la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano en condiciones de estrés de temperaturas elevadas de 32 °C a 40 °C, también puede tener efectos en la degradación de la insulina, su precipitación y el cambio de color de la coformulación. Se encuentra dentro del nivel de un experto en la materia controlar estas condiciones dentro de los parámetros y orientaciones de seguridad y farmacológicos deseados. En general, las coformulaciones estables proporcionadas en
45 el presente documento contienen un inhibidor de hialuronidasa, tal como HA, son estables a temperaturas elevadas, tales como en condiciones de estrés de temperaturas de 32 °C a 40 °C durante al menos 3 horas pero no más de 7 días debido a los efectos en estos parámetros.

50 En algunos ejemplos proporcionados en el presente documento, se usa un inhibidor de hialuronidasa que no es capaz de formar complejos covalentes con la insulina o enzimas degradantes de hialuronano. De este modo, los inhibidores no covalentes que pueden actuar mediante unión asociativa se contemplan en las formulaciones en el presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan coformulaciones que contienen HA con un extremo reductor reaccionado de tal forma que ya no es posible formar aductos de glucación con insulina. Por ejemplo, en algunos ejemplo, el HA usado en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento se
55 ha modificado mediante aminación reductora. La aminación reductora implica la formación de una base de Schiff entre un aldehído y una amina, que posteriormente se reduce para formar la amina más estable. El extremo reductor de un azúcar, es decir, HA, existe una mezcla en equilibrio de la forma de hemiacetal cíclico y la forma de aldehído de cadena abierta. En condiciones adecuadas conocidas para un experto en la materia, los grupos amina se condensarán con el aldehído del azúcar para formar un ión iminio que puede reducirse a una amina, con un agente reductor, tal como cianoborohidruro de sodio (véase, por ejemplo, Gildersleeve et al., (2008) Bioconjug Chem 19(7):1485-1490). El HA resultante no es reactivo con la insulina y es incapaz de formar aductos de glucación con la
60 insulina.

65 En particular, en el presente documento se proporciona una composición de coformulación estable que es estable durante al menos 3 días a una temperatura desde o desde aproximadamente 32 °C a 40 °C y/o es estable durante al menos 3 horas en agitación que contiene de 100 U/ml a 1000 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal

como una hialuronidasa, por ejemplo una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), y en particular a o a aproximadamente o al menos 600 U/ml; 10 U/ml a 1000 U/ml de una insulina de acción rápida, y en particular de al menos o aproximadamente 100 U/ml; NaCl a una concentración entre o de aproximadamente entre 120 mM a 200 mM; un pH de entre o aproximadamente entre 6,5 a 7,5; una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante o de una
 5 mezcla de conservantes; y uno o más agentes estabilizantes adicionales, tales como un inhibidor de hialuronidasa, de tal forma que se retiene al menos un 50 % de la actividad inicial de enzima degradante de hialuronano, tal como al menos o aproximadamente al menos 375 U/ml de actividad de enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, la coformulación puede contener HA a una concentración de entre o aproximadamente entre 1 mg/ml a 20 mg/ml. Las
 10 coformulaciones estables también pueden contener un agente tamponador para mantener el intervalo de pH de entre o aproximadamente pH 6,5 (por ejemplo, Tris) en una cantidad que se encuentra entre o aproximadamente entre 1 mM a 100 mM; una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante o de una mezcla de conservantes, por ejemplo, un conservante fenólico (por ejemplo, fenol y/o m-cresol) en una cantidad total como porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) en la formulación que es de o es de entre un 0,1 % y un 0,4 %; un
 15 tensioactivo (por ejemplo, poloxamer 188) en forma de un % de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,005 % al 1,0 %; y opcionalmente un agente estabilizante adicional.

Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que son estables en condiciones de estrés (por ejemplo, temperatura elevada de 32 °C a 40 °C o agitación) durante al menos 3 días o 3 horas contienen de 120 mM a 200 mM, tal como de 150 mM de NaCl a 200 mM de NaCl o de 160 mM de NaCl a 180 mM de NaCl,
 20 por ejemplo de o aproximadamente de 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 155 mM, 160 mM, 165 mM, 170 mM, 175 mM, 180 mM, 185 mM, 190 mM, 195 mM o 200 mM de NaCl. Asimismo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que son estables en condiciones de estrés (por ejemplo, temperatura elevada de 32 °C a 40 °C o agitación) durante al menos 3 días o 3 horas contienen un pH de 6,5 a 7,5 o de 6,5 a 7,2, tal como un pH de o de aproximadamente 6,5 ± 0,2, 6,6 ± 0,2, 6,7 ± 0,2, 6,8 ± 0,2, 6,9 ± 0,2, 7,0 ± 0,2, 7,1 ± 0,2, 7,2 ± 0,2, 7,3 ± 0,2, 7,4 ±
 25 0,2 o 7,5 ± 0,2.

En los ejemplos en el presente documento, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento que son estables en condiciones de estrés de temperaturas elevadas (por ejemplo, de 32 °C a 40 °C) o agitación durante al menos 3 días o 3 horas contienen hialuronano (ácido hialurónico; HA) que tiene un peso molecular de 5 kDa a 5.000
 30 kDa, de 5 kDa a o a aproximadamente 1.000 kDa, de 5 kDa a o a aproximadamente 200 kDa, o de 5 kDa a o a aproximadamente 50 kDa. En particular, el peso molecular del HA es menor de 10 kDa. El HA puede ser un oligosacárido, compuesto de disacáridos, tal como de un 2mero a un 30mero o de un 4mero a un 16mero. Las coformulaciones de insulina y una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una
 35 PH20 (por ejemplo, rHuPH20) contienen HA a una concentración de entre o aproximadamente entre 1 mg/ml a 20 mg/ml, tal como al menos o aproximadamente 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml o 20 mg/ml o más de HA. Las coformulaciones estables ejemplares incluyen desde o desde aproximadamente 8 mg/ml a o a aproximadamente 12 mg/ml de HA, tales como, por ejemplo, 10 mg/ml o aproximadamente 10 mg/ml. En algunos ejemplos, la relación molar de HA a enzima degradante de hialuronano es o es de aproximadamente
 40 100.000:1, 95.000:1, 90.000:1, 85.000:1, 80.000:1, 75.000:1, 70.000:1, 65.000:1, 60.000:1, 55.000:1, 50.000:1, 45.000:1, 40.000:1, 35.000:1, 30.000:1, 25.000:1, 20.000:1, 15.000:1, 10.000:1, 5.000:1, 1.000:1, 900:1, 800:1, 700:1, 600:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, o 100:1 o menor.

Ya que las coformulaciones que son estables a temperaturas elevadas (por ejemplo, de 32 °C a 40 °C) o agitación, tal como se desea para las formulaciones de CSII, tienen un pH reducido y una concentración de sal aumentada en
 45 comparación con las coformulaciones expuestas anteriormente en la sección E.1.a, pueden prepararse o derivarse a partir de las mismas. Esto puede lograrse, por ejemplo, diluyendo una coformulación, tal como cualquiera proporcionada en la sección E.1.a que sea adecuada para MDI con un diluyente estabilizante que tiene un bajo pH y una alta concentración de sal. Por ejemplo, el diluyente puede ser una solución con alto NaCl con tampón a un pH menor y conservantes. Por ejemplo, el diluyente puede contener de 10 mM a 50 mM de Tris u otro tampón similar;
 50 de 120 mM a 200 mM de NaCl; del 0,1 % al 0,4 % de conservante. El diluyente puede prepararse a un pH de entre o aproximadamente entre 6,5 a 7,8. De este modo, una coformulación proporcionada en el presente documento que sea estable a de 2 °C a 8 °C o de 20 °C a 30 °C puede proporcionarse y mezclarse con diluyente para proporcionar una coformulación que sea estable en condiciones de estrés de temperaturas elevadas (por ejemplo, de 32 °C a 40
 55 °C) durante al menos 3 días o de agitación durante al menos 3 horas.

Por ejemplo, puede diluirse cualquiera de las coformulaciones para MDI anteriores en la sección E.1.a con un diluyente estabilizante, dando como resultado una formulación de CSII con menor concentración de insulina, un pH de o desde o desde aproximadamente 6,8 a o a aproximadamente 7,0 (tal como de o de aproximadamente 6,8, 6,9 o
 60 7,0) y una concentración de NaCl de o desde o desde aproximadamente 150 mM a o a aproximadamente 200 mM.

En otros ejemplos, la coformulación de MDI estable puede proporcionarse en forma de una formulación de MDI que contiene concentraciones de insulina mayores y concentraciones de PH20 mayores y menos NaCl (entre o aproximadamente entre 80 mM a 150 mM) y menor capacidad tamponadora para proporcionar una tonicidad
 65 aceptable y un pH menor después de mezclar con el diluyente del excipiente estabilizante. Por ejemplo, la concentración mayor de insulina puede ser, por ejemplo, de 120 a 500 Unidades, tal como 150, 200 o 500 Unidades

(U) y la concentración mayor de PH20 puede ser de 6 a 25 µg/ml, tal como de 6 a 25 6, 7,5, 10 o 25 µg/ml. La dilución de una formulación de MDI de alta concentración modificada con un diluyente estabilizante puede proporcionar una formulación de CSII con menor pH (por ejemplo, de 6,5 a 7,2) y NaCl aumentado (de 140 mM a 200 mM) que cualquiera de las coformulaciones de MDI en la sección E.1.a anterior.

5 En un ejemplo adicional, cualquiera de las formulaciones de MDI proporcionadas en el presente documento en la sección E.1.a puede prepararse y almacenarse en forma liofilizada. Inmediatamente antes de su uso en condiciones de estrés, el producto liofilizado puede diluirse con diluyente estabilizante que contiene un menor pH (por ejemplo, de 6,5 a 7,8) y NaCl aumentado (de 120 mM a 200 mM) dando como resultado una formulación de CSII con menor
10 pH (por ejemplo, de 6,5 a 7,8) y NaCl aumentado (de 120 mM a 200 mM) que cualquiera de las coformulaciones de MDI proporcionadas en la sección E.1.a anterior.

Tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento, sin embargo, el hialuronano no es adecuado para su uso con formulaciones almacenadas a de 2 °C a 8 °C, ya que hace que la insulina se agregue a temperaturas
15 menores. Por lo tanto, en los ejemplos anteriores en donde la formulación estable de CSII se genera a partir de dilución de una formulación de MDI y la coformulación de MDI o la coformulación de MDI concentrada modificada no contiene un inhibidor de hialuronidasa, puede incluirse un inhibidor de hialuronidasa en el diluyente estabilizante para proporcionar la concentración adecuada de inhibidor de hialuronidasa para mantener la estabilidad de la coformulación en condiciones de estrés de temperaturas elevadas (por ejemplo, de 32 °C a 40 °C) durante al menos
20 3 días o agitación durante al menos 3 horas.

c. Coformulaciones de Lys-Lys ejemplares

En el presente documento se proporcionan coformulaciones estables que contienen una cantidad terapéuticamente
25 eficaz de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina de acción rápida, tal como un análogo de insulina de acción rápida (por ejemplo, de rápida acción), y una cantidad de Lys-Lys para hacer que la coformulación sea estable. Típicamente, las coformulaciones son formulaciones multidosis y también contienen una cantidad
30 microbianamente eficaz de uno o más conservantes. Las coformulaciones también pueden contener otros uno o más estabilizantes o excipientes. Dichas coformulaciones son estables durante al menos 6 meses a una temperatura de desde o desde aproximadamente 2 °C a o a aproximadamente 8 °C y durante al menos 14 días (es decir, 2 semanas) a una temperatura de desde o de aproximadamente 20 °C a o a aproximadamente 30 °C. En particular, dichas coformulaciones son estables en condiciones aceleradas, tales como temperaturas elevadas mayores de o
35 de aproximadamente mayores de 32°C, tales como de 35 °C a 40 °C, en particular mayor de o de aproximadamente o de 37 °C o 40 °C y/o condiciones de agitación durante al menos 3 horas, y generalmente al menos 3 días. Las coformulaciones pueden usarse para su uso en métodos de inyección multidosis (MDI) o para infusión de insulina subcutánea continua (CSII).

Las formulaciones ejemplares estables que contienen Lys-Lys se describen a continuación. Las siguientes
40 formulaciones estables son solo ejemplares y proporcionan una plataforma a partir de la cual pueden efectuarse ajustes menores. Se entiende que pueden efectuarse cambios muy pequeños en las concentraciones de los diversos excipientes y otros componentes (por ejemplo, ± 15 % de las concentraciones indicadas), o pequeños cambios en el pH, a la vez que se retienen una parte si no la totalidad de la solubilidad y estabilidad de la insulina y de la estabilidad de la enzima degradante de hialuronano. También pueden efectuarse cambios adicionales
45 añadiendo o eliminando excipientes.

Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen: de 100 U/ml a 1000 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), y en particular a o a aproximadamente o al menos 600 U/ml; 10 U/ml a 1000 U/ml de una insulina de acción rápida, y en particular de al menos o aproximadamente 100 U/ml; las coformulaciones contienen además Lys-Lys a una
50 concentración de entre o aproximadamente entre 50 mM a 120 mM, tal como de 50 a 80 mM, 80 mM a 100 mM o 100 mM a 120 mM, un pH de entre o aproximadamente entre 6,5 a 8,0, por ejemplo, de 6,5 a 7,8 o de 6,8 a 7,8, tal como de entre o de aproximadamente entre 6,5 a 7,5, 6,8 a 7,4 o 7,0 a 7,6, un agente tamponador que mantiene el intervalo de pH, una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante o de una mezcla de conservantes, y un agente estabilizante en una cantidad que, a lo largo de la duración del almacenamiento (temperatura y tiempo), retiene al menos un 50 % de la actividad de la enzima degradante de hialuronano y retiene al menos el 90 % de la pureza, recuperación y/o potencia de la insulina. Por ejemplo, las coformulaciones proporcionadas en el presente documento contienen de un 0,0005 % a un 1,0 % (por ejemplo, de un 0,0005 % a un 0,005 %) de tensioactivo como agente estabilizante. Las coformulaciones pueden contener opcionalmente agentes estabilizantes adicionales,
60 modificadores de la tonicidad, un agente antioxidante y/u otros excipientes. Por ejemplo, las coformulaciones contienen NaCl a una concentración de menos de 140 mM, tal como de entre o aproximadamente entre 0 mM a 100 mM, por ejemplo, entre o aproximadamente entre 0 mM a 50 mM, 10 mM a 40 mM o 20 mM a 30 mM.

En un ejemplo, una formulación ejemplar contiene: 100 U/ml a 1000 U/ml, de una enzima degradante de
65 hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), y en particular al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 600 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una

5 hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20); 10 U/ml a 1000 U/ml de insulina glulisina, y en particular al menos o aproximadamente 100 U/ml o de aproximadamente 50 mM a o a aproximadamente 105 mM de Lys-Lys (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM o 100 mM); de 0 mM a o a aproximadamente 50 mM de metionina (por ejemplo, entre o aproximadamente entre 5 mM a 20 mM, tal como al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM de metionina); y desde o desde aproximadamente un 0,0005 % a o a aproximadamente un 0,005 % de polisorbato 20, tal como de un 0,001 % a un 0,005 % (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos un 0,0005 %, 0,0001 %; 0,005 % o 0,001 % de polisorbato 20); y conservantes que incluyen fenol a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,25 % y m-cresol a un % en p/v de entre o entre aproximadamente el 0,05 % al 0,2 %. Las formulaciones se preparan con un pH desde o desde aproximadamente 6,8 a 7,4, (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos pH 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 o 7,4). En ejemplos adicionales, el NaCl se incluye a una concentración menor de 140 mM. Por ejemplo, se incluye NaCl en una concentración menor de 100 mM, tal como de al menos o aproximadamente al menos 0 mM a 100 mM, por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM o 90 mM.

15 En otro ejemplo, una formulación ejemplar contiene: 100 U/ml a 1000 U/ml, de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20), y en particular al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 600 U/ml de una enzima degradante de hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una PH20 (por ejemplo, rHuPH20); 10 U/ml a 1000 U/ml de insulina lispro o aspart, y en particular al menos o aproximadamente 100 U/ml o de aproximadamente 80 mM a o a aproximadamente 100 mM de Lys-Lys (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM o 100 mM); de 0 mM a o a aproximadamente 50 mM de metionina (por ejemplo, entre o aproximadamente entre 5 mM a 20 mM, tal como al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM de metionina); desde o desde aproximadamente un 0,0005 % a o a aproximadamente un 0,005 % de polisorbato 20, tal como de un 0,001 % a un 0,005 % (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos un 0,0005 %, 0,0001 %; 0,005 % o 0,001 % de polisorbato 20); y conservantes que incluyen fenol a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre o aproximadamente entre el 0,01 % al 0,25 % y m-cresol a un % en p/v de entre o entre aproximadamente el 0,05 % al 0,2 % de fenol. Las formulaciones se preparan con un pH desde o desde aproximadamente 6,8 a 7,4, (por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos pH 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 o 7,4). En ejemplos adicionales, el NaCl se incluye a una concentración menor de 140 mM. Por ejemplo, se incluye NaCl en una concentración menor de 100 mM, tal como de al menos o aproximadamente al menos 0 mM a 100 mM, por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM o 90 mM.

35 G. Dosificación y administración

Las composiciones proporcionadas en el presente documento que son formulaciones estables de una enzima degradante de hialuronano pueden formularse en forma de composiciones farmacéuticas para administración monodosis o multidosis. Las coformulaciones de una enzima degradante de hialuronano y una insulina de acción rápida se formulan en forma de composiciones farmacéuticas para administración multidosis. Las formulaciones y coformulaciones pueden formularse para cualquier ruta adecuada, tales como, por ejemplo, administración parenteral, incluyendo subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, y administración intradérmica. Típicamente, las formulaciones o coformulaciones proporcionadas en el presente documento se administran por vía subcutánea.

45 Las dosis terapéuticamente eficaces pueden determinarse empíricamente ensayando las formulaciones o coformulaciones en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos y también pueden individualizarse para cada sujeto basándose en factores tales como metabolismo, ingesta de comida y gravedad de la enfermedad. La concentración de una enzima degradante de hialuronano y/o una insulina seleccionada en la formulación o coformulación depende de, por ejemplo, las velocidades de absorción, inactivación y excreción del complejo, las características fisicoquímicas del complejo, la pauta de dosificación, la cantidad administrada, así como otros factores conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, para las coformulaciones con insulina, se entiende que la dosificación de tratamiento precisa es una función de los niveles de glucosa en sangre en un sujeto, y pueden determinarse empíricamente usando algoritmos conocidos o mediante extrapolación a partir de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*, la experiencia pasada del sujeto, el recuento de carbohidratos para determinar el contenido de carbohidratos en una comida y, por lo tanto, el aumento de glucosa en sangre prandial estimado y la posterior necesidad de insulina. Cabe destacar que los valores de concentración y dosificación pueden variar dependiendo de cada sujeto tratado. También debe entenderse que para cualquier sujeto concreto, deben ajustarse los regímenes de dosificación a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las formulaciones. y que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son solo ejemplares y no están previstos para limitar el alcance de los mismos. La cantidad de una insulina seleccionada para su administración para el tratamiento de una afección diabética puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos.

65 Por lo tanto, la dosificación precisa, que puede determinarse empíricamente, puede depender de la enzima degradante de hialuronano y/o de insulina contenida en las formulaciones o coformulaciones, del régimen y pauta de

dosificación, de la vía de administración, del tipo de diabetes que se va a tratar, de la gravedad de la enfermedad y del sujeto que se esté tratando. En general, la insulina se proporciona en una cantidad que logra el control glucémico. Por ejemplo, para lograr el control glucémico postprandial, típicamente se administra a los sujetos diabéticos una inyección de bolo de o de aproximadamente 0,05 U de insulina de acción rápida por kg de peso corporal (U/kg) a 1,0 U/kg de 30 a 5 minutos antes de una comida, cuando se administra la insulina sin una enzima degradante de hialuronano. Se entiende que esta dosis puede aumentarse o disminuirse según sea adecuado basándose en, por ejemplo, el metabolismo de un sujeto particular, el contenido de la comida, y los niveles de glucosa en sangre. Además se entiende que puede cambiarse el tiempo al que se administra la insulina para el control glucémico postprandial para que sea más próximo o lejano al tiempo de ingestión de una comida, y, en algunos casos, puede cambiarse de tal modo que la insulina se administra en el momento de la comida o después de la comida.

Las insulinas de acción rápida se administran típicamente a dosis de entre 0,05 Unidades/kg a 0,25 Unidades/kg, tales como, por ejemplo, 0,10 Unidades/kg, aunque la dosis particular varía. Debido a las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas de la insulina coformulada con enzimas degradantes de hialuronano (tal como rHuPH20), las coformulaciones proporcionadas pueden administrarse a dosis menores en comparación con la insulina de acción rápida administrada en ausencia de una enzima degradante de hialuronano. El grado hasta el que puede disminuirse la cantidad de una insulina de acción rápida mediante su administración en forma de una coformulación con una enzima degradante de hialuronano depende de, por ejemplo, el tipo de diabetes que tiene el paciente y el tipo de insulina contenida en la coformulación. Típicamente, la reducción en la cantidad de insulina de acción rápida administrada a pacientes diabéticos de tipo 2 cuando se administra en forma de una coformulación con enzima degradante de hialuronano es mayor que la reducción en la cantidad de insulina de acción rápida administrada a pacientes diabéticos de tipo 1 cuando se administra en forma de una coformulación con una enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, en los casos en donde se administran tanto a un paciente diabético de tipo 1 como a un paciente diabético de tipo 2 0,20 U/kg de insulina de acción rápida para controlar los niveles postprandiales de glucosa, pueden administrarse al paciente diabético de tipo 1 0,15 U/kg de insulina de acción rápida coformulada con una enzima degradante de hialuronano para lograr el mismo control glucémico o mejor, y pueden administrarse al paciente diabético de tipo 2 0,10 U/kg de insulina de acción rápida coformulada con una enzima degradante de hialuronano para lograr el mismo control glucémico o mejor.

Los intervalos de dosificación ejemplares para administración parenteral, tales como subcutáneas, de insulina usando las coformulaciones con una enzima degradante de hialuronano proporcionada en el presente documento para controlar los niveles de glucosa en sangre postprandiales son desde o de aproximadamente 0,05 U/kg a 0,50 U/kg, tal como 0,05 U/kg, 0,06 U/kg, 0,07 U/kg, 0,08 U/kg, 0,09 U/kg, 0,10 U/kg, 0,11 U/kg, 0,12 U/kg, 0,13 U/kg, 0,14 U/kg, 0,15 U/kg, 0,20 U/kg, 0,25 U/kg, 0,30 U/kg, 0,40 U/kg, 0,50 U/kg o 1,0 U/kg. La dosificación particular depende de la enfermedad y del individuo.

Las coformulaciones de insulina y una enzima degradante de hialuronano proporcionadas en el presente documento también pueden administrarse a sujetos diabéticos para efectuar el control glucémico durante el día y la noche, además del control glucémico postprandial. Típicamente, las dosificaciones de insulina administradas para proporcionar control glucémico continuo son menores que aquellas necesarias para lograr el control glucémico postprandial. Las dosificaciones, sin embargo, pueden aumentarse o disminuirse basándose en los niveles de glucosa en sangre. Los intervalos de dosificación ejemplares para administración parenteral, tales como subcutáneas, la administración de insulina administrada en forma de una coformulación con una enzima degradante de hialuronano para proporcionar control glucémico continuo son desde o de aproximadamente 0,001 U/kg a 0,30 U/kg, tal como 0,001 U/kg, 0,005 U/kg, 0,01 U/kg, 0,02 U/kg, 0,05 U/kg a 0,30 U/kg, tal como 0,05 U/kg, 0,06 U/kg, 0,07 U/kg, 0,08 U/kg, 0,09 U/kg, 0,10 U/kg, 0,11 U/kg, 0,12 U/kg, 0,13 U/kg, 0,14 U/kg, 0,15 U/kg, 0,20 U/kg, 0,25 U/kg, 0,30 U/kg, 0,40 U/kg, 0,50 U/kg o 1,0 U/kg. La dosificación particular depende de la enfermedad, del tiempo de administración, y del individuo. Según necesidad, la dosificación puede determinarse empíricamente.

Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función de la diabetes que se esté tratando y puede determinarse empíricamente usando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Cabe destacar que los valores de dosificación también pueden variar dependiendo de la gravedad de la diabetes y de otros factores, tales como el metabolismo, la ingesta de comida, y el peso corporal del sujeto. También debe entenderse que para cualquier sujeto concreto, deben ajustarse las regímenes y pautas de dosificación a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son solo ejemplares y no están previstos para limitar el alcance o uso de las composiciones y combinaciones que los contienen. Las composiciones pueden administrarse cada minuto, cada varios minutos, cada hora, días, semanalmente, mensualmente, anualmente o una vez, dependiendo del sujeto y del estado diabético. En general, los regímenes de dosificación se seleccionan para limitar la toxicidad y/u otros efectos negativos, tales como exceso de insulina. Cabe destacar que el médico tratante sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia para disminuir la dosificación. Por el contrario, el médico tratante también sabrá cómo y cuándo ajustar el tratamiento a mayores niveles si la respuesta clínica no es la adecuada (imposibilitando los efectos secundarios tóxicos).

Modo de administración**a. Jeringuillas o viales**

5 Las formulaciones o coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden administrarse por vía parenteral a un sujeto usando uno o más de diversos modos de administración, incluyendo, pero sin limitación, jeringas, viales u otros envases adecuados para formulaciones monodosis o multidosis. Por ejemplo, las jeringuillas de un solo uso, incluyendo las jeringuillas para insulina, pueden usarse para administrar inyecciones discretas, por ejemplo, inyecciones en bolo, de las composiciones. Las jeringuillas útiles para la administración de las
 10 composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen jeringuillas de insulina, que pueden diseñarse para contener concentraciones estándar de preparaciones de insulina, incluyendo concentraciones de 100 U/ml de preparaciones de insulina, y tienen marcas en unidades de insulina para facilitar la administración.

b. Bolígrafo de insulina

15 Un bolígrafo de insulina es un sistema de administración que puede usarse para administrar las coformulaciones proporcionadas en el presente documento. Los bolígrafos de insulina incluyen aquellos con cartuchos reemplazables cargados con la composición que se va a administrar y aquellos con cartuchos no reemplazables. Los bolígrafos de insulina con cartuchos no reemplazables típicamente se desechan cuando se ha vaciado el cartucho. Los bolígrafos de insulina permiten la dosificación en, por ejemplo, aumentos de media unidad, una unidad o dos unidades, que se miden generalmente usando una rueda de dosificación u otro mecanismo para ajustar la dosis (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.947.934, 6.074.372, 6.110.149, 6.524.280, 6.582.404). Entonces se administra la coformulación a través de una fina aguja acoplada al bolígrafo. Los bolígrafos de insulina se conocen bien en la técnica e incluyen aquellos descritos en otras partes, incluyendo, pero sin limitación, aquellos descritos en las
 20 Patentes de Estados Unidos n.º 5.947.934, 4.973.318, 5.462.535, 5.599.323, 5.626.566, 5.984.906, 6.074.372, 6.110.149, 6.302.869, 6.379.339 y 7.241.278). Otros dispositivos de dosificación similares, tales como, por ejemplo, aquellos descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.947.934, 6.074.372, 6.110.149 y 6.379.339 también pueden usarse para administrar las composiciones proporcionadas en el presente documento, bien como una coformulación de insulina y enzima degradante de hialuronano o por separado en forma de una composición de insulina y una composición de enzima degradante de hialuronano. En algunos ejemplos, el bolígrafo de insulina o un dispositivo similar también contiene un sensor o monitor que puede medir el nivel de glucosa en sangre (véase, por ejemplo, el documento WO2003047426).

35 Los bolígrafos de insulina y los dispositivos similares que pueden usarse, o modificarse para su uso, para administrar las coformulaciones proporcionadas en el presente documento se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, aquellos comercializados con los nombres comerciales Autopen® (Owen Mumford, Inc.), Disetronic Pen (Disetronic Medical Systems), Humalog Pen (Eli Lilly and Company), Humalog® Mix 75/25 Pen (Eli Lilly and Company), Humulin® 70/30 Pen (Eli Lilly and Company), Humulin® N Pen (Eli Lilly and Company), Novolog® FlexPen (Novo Nordisk), NovoPen® 3 (Novo Nordisk), NovoPen® 4 (Novo Nordisk), NovoPen® Junior (Novo Nordisk), Novolog® Mix 70/30 FlexPen (Novo Nordisk), InDuo® (Novo Nordisk), Novolin® InnoLet® (Novo Nordisk), Innovo® (Novo Nordisk), OptiPen® (Sanofi-Aventis) OptiPen® Pro2 (Sanofi-Aventis), OptiSet® (Sanofi-Aventis) y SoloSTAR® (Sanofi-Aventis).

c. Bombas de insulina y otros dispositivos de administración de insulina

45 Las coformulaciones proporcionadas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto diabético usando un dispositivo de administración de insulina, tal como una bomba de insulina u otro dispositivo de infusión continua similar. Los dispositivos de administración de insulina contienen típicamente al menos un depósito desechable que contiene una formulación de insulina, una bomba (incluyendo cualquier control, programa informático, módulos de procesamiento y/o baterías) y un conjunto de infusión desechable, incluyendo una cánula o aguja para inyección subcutánea y un tubo que conecta la cánula o la aguja al depósito de insulina. Para su uso con las coformulaciones estables proporcionadas en el presente documento, el dispositivo de administración de insulina puede contener un depósito que contiene la insulina coformulada y la enzima degradante de hialuronano. Las coformulaciones pueden administrarse de manera continua o en inyecciones de bolo. Además, un usuario de un dispositivo de administración de insulina tiene la capacidad para influenciar el perfil de la insulina ajustando el bolo. Por ejemplo, puede administrarse un bolo estándar, que es una infusión similar a una inyección discreta en tanto que la totalidad de la dosis se bombea de manera inmediata. Un bolo extendido es una infusión lenta a lo largo que evita una alta dosis inicial y prolonga la acción de la composición. También puede administrarse un bolo de combinación que contiene tanto un bolo estándar como un bolo extendido usando una bomba de insulina u otro sistema de administración continuo. Los dispositivos de administración de insulina se conocen en la técnica y se describen en otras partes, incluyendo, pero sin limitación, en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.554.798, 6.641.533, 6.744.350, 6.852.104, 6.872.200, 6.936.029, 6.979.326, 6.999.854, 7.025.743 y 7.109.878. Los dispositivos de administración de insulina también pueden conectarse a un monitor o sensor de glucosa, y/o pueden contener un medio para calcular la dosis de insulina recomendada basándose en los niveles de glucosa en sangre, el contenido de carbohidratos de una comida, u otros factores. Los dispositivos de administración de insulina adicionales pueden ser implantables o externos para el sujeto.

d. Sistemas de bomba de infusión continua

Un dispositivo de administración de insulina para su uso con las coformulaciones en el presente documento incluye una bomba de insulina u otro dispositivo similar capaz de infusión de insulina subcutánea continua. Los dispositivos de administración de insulina, incluyendo sistemas de bucle abierto o de bucle cerrado, contienen típicamente al menos un depósito desechable que contiene una coformulación de insulina, una bomba (incluyendo cualquier control, programa informático, módulos de procesamiento y/o baterías) y un conjunto de infusión desechable, incluyendo una cánula o aguja para inyección subcutánea y un tubo que conecta la cánula o la aguja al depósito de insulina. Los dispositivos de administración de bucle cerrado incluyen adicionalmente un monitor o sensor de glucosa. El dispositivo de administración de insulina puede contener un depósito que contiene una coformulación de insulina de acción súper rápida de insulina y una enzima degradante de hialuronano.

Las coformulaciones de insulina pueden administrarse de manera continua y/o en inyecciones de bolo. Los usuarios pueden ajustar la bomba para administrar un caudal constante o cantidad "basal" de formulación de insulina de manera continua durante el día. Las bombas también liberan dosis ("bolos") adicionales de formulación de insulina durante las comidas y en los momentos cuando el azúcar en sangre es demasiado alto basándose en los datos del usuario. El control de glucosa en sangre frecuente es esencial para determinar las dosis de insulina y para asegurar que la insulina se administra de manera adecuada. Esto puede lograrse mediante control manual, o mediante un monitor de glucosa por separado o incluido. Además, un usuario de un dispositivo de administración de insulina tiene la capacidad para influenciar el perfil de la insulina ajustando el bolo. Por ejemplo, puede administrarse un bolo estándar, que es una infusión similar a una inyección discreta en tanto que la totalidad de la dosis se bombea de manera inmediata. Un bolo extendido es una infusión lenta a lo largo que evita una alta dosis inicial y prolonga la acción de la composición. También puede administrarse un bolo de combinación que contiene tanto un bolo estándar como un bolo extendido usando una bomba de insulina u otro sistema de administración continuo.

Los dispositivos de administración de insulina se conocen en la técnica y se describen en otras partes, incluyendo, pero sin limitación, en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.554.798, 6.641.533, 6.744.350, 6.852.104, 6.872.200, 6.936.029, 6.979.326, 6.999.854, 7.025.743 y 7.109.878. Los dispositivos de administración de insulina también pueden conectarse a un monitor o sensor de glucosa, por ejemplo, un sistema de bucle cerrado, y/o pueden contener un medio para calcular la dosis de insulina recomendada basándose en los niveles de glucosa en sangre, el contenido de carbohidratos de una comida, u otros factores. Los dispositivos de administración de insulina adicionales pueden ser implantables o externos para el sujeto. El uso de bombas de infusión de insulina externas requiere una selección cuidadosa de los individuos, un control meticuloso, y una educación exhaustiva y un seguimiento continuo a largo plazo. Este cuidado se proporciona generalmente por un equipo multidisciplinario de profesionales de la salud expertos y con experiencia específica en el control de individuos en tratamiento con bomba de insulina.

i. Sistemas de bucle abierto

Los sistemas de bucle abierto pueden usarse con las coformulaciones proporcionadas en el presente documento. Los sistemas de bucle abierto contienen típicamente al menos un depósito desechable que contiene una formulación de insulina, una bomba (incluyendo cualquier control, programa informático, módulos de procesamiento y/o baterías) y un conjunto de infusión desechable, incluyendo una cánula o aguja para inyección subcutánea y un tubo que conecta la cánula o la aguja al depósito de insulina. El sistema de bucle abierto infunde en pequeñas dosis (basales) cada pocos minutos y grandes dosis (bolos) que el paciente ajusta manualmente. Sin embargo, un sistema de bucle abierto no contiene generalmente un monitor o sensor de glucosa y por lo tanto no pueden responder a los cambios en los niveles de glucosa en suero del paciente. Los expertos en la materia conocen diversos métodos y dispositivos usados para medir los niveles de glucosa en sangre. La técnica convencional usada por muchos diabéticos para controlar personalmente su nivel de glucosa en sangre incluye la extracción periódica de sangre, la aplicación de esa sangre a una tira reactiva, y la determinación del nivel de glucosa en sangre usando detección calorimétrica, electroquímica o fotométrica. Se han desarrollado una diversidad de dispositivos para el control continuo o automático de analitos, tales como glucosa, en el torrente sanguíneo o fluido intersticial. Algunos de estos dispositivos usan sensores electroquímicos que se implantan directamente en un vaso sanguíneo o en el tejido subcutáneo de un paciente. Los métodos y dispositivos ejemplares para controlar los niveles de glucosa incluyen, pero sin limitación, aquellos descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.001.054, 5.009.230, 5.713.353, 6.560.471, 6.574.490, 6.892.085, 6.958.809, 7.299.081, 7.774.145, 7.826.879, 7.857.760 y 7.885.699, que se incorporan en el presente documento por referencia.

Los sistemas de administración de insulina, tales como bombas de insulina, se conocen en la técnica y pueden usarse en los sistemas de bucle abierto. Los dispositivos de administración de insulina de bucle abierto ejemplares (tales como aquellos descritos anteriormente) incluyen, pero sin limitación, aquellos descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.562.751, 4.678.408, 4.685.903, 4.373.527, 4.573.994, 6.554.798, 6.641.533, 6.744.350, 6.852.104, 6.872.200, 6.936.029, 6.979.326, 6.999.854, 7.109.878, 7.938.797 y 7.959.598, que se incorporan en el presente documento por referencia. Estos sistemas y otros similares, fácilmente identificables por un experto en la materia, pueden usarse para administrar las coformulaciones proporcionadas en el presente documento. Los dispositivos de administración de insulina contienen típicamente uno o más depósitos, que generalmente son

desechables, que contienen una preparación de insulina, tal como una coformulación de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano del presente documento. En algunos ejemplos, las coformulaciones se administran usando un tubo de infusión y una cánula o aguja. En otros ejemplos, el dispositivo de infusión se acopla directamente a la piel y las coformulaciones fluyen a partir del dispositivo de infusión, a través de una cánula o aguja directamente en el organismo sin el uso de un tubo. En ejemplos adicionales, el dispositivo de infusión es interno en el organismo y puede usarse un tubo de infusión para administrar las coformulaciones.

ii. Sistemas de bucle cerrado

Los sistemas de bucle cerrado, en ocasiones citados como páncreas artificial, son de particular interés para su uso con las coformulaciones proporcionadas en el presente documento. Los sistemas de bucle cerrado se refieren a sistemas con un monitor de glucosa continuo integrado, una bomba de insulina u otro sistema de administración y un controlador que incluye un algoritmo matemático que calcula constantemente la infusión necesaria de insulina para el control glucémico basándose en mediciones en tiempo real de los niveles de glucosa en sangre. Dichos sistemas, cuando se optimizan, pueden facilitar un control glucémico constante y muy estrecho, similar a la respuesta natural de insulina y el control glucémico observado en un sujeto sano no diabético. Para que sean eficaces, sin embargo, los sistemas de bucle cerrado requieren un monitor de glucosa continuo tanto fiable como preciso, y la administración de una insulina con una acción muy rápida. Por ejemplo, los retrasos en la absorción y la acción de la insulina asociados con la administración subcutánea de insulinas de acción rápida pueden dar lugar a grandes alteraciones glucémicas postprandiales (Hovorka et al. (2006) *Diabetic Med.* 23:1-12). El retraso debido a la absorción de la insulina, la acción de la insulina, la cinética intersticial de la glucosa, y el tiempo de transporte para los sistemas de control basados *ex vivo*, tales como aquellos basados en la técnica de microdiálisis, pueden dar como resultado un retraso general de 100 minutos o más tiempo desde la administración de la insulina hasta el pico de su efecto reductor de glucosa detectable (Hovorka et al. (2006) *Diabetic Med.* 23:1-12). Por lo tanto, una vez administrada, la insulina continuará aumentando su efecto medible durante aproximadamente 2 horas. Esto puede complicar la reducción eficaz de la concentración de glucosa después de la ingestión de una comida usando un sistema de bucle cerrado. En primer lugar, tiene que detectarse un aumento de la glucosa. Sin embargo, esto sucede típicamente solo después de un retraso de aproximadamente 10-40 minutos. El sistema tiene que determinar que se ha digerido una comida y administrar una dosis de insulina adecuada. La capacidad del sistema para compensar posteriormente respecto de una dosis de insulina "mal evaluada" se ve comprometido por los grandes retrasos y la incapacidad para "extraer" la insulina una vez administrada. Dichos problemas pueden, al menos en parte, superarse mediante el uso de coformulaciones de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano, tales como aquellos proporcionados en el presente documento, que pueden mostrar una velocidad y un nivel aumentado de absorción y una mejora asociada en la farmacodinámica (véanse, por ejemplo, los documentos US20090304665 y WO2009134380). Las coformulaciones de insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano tienen un $t_{m\acute{a}x}$ reducido (es decir, logran una concentración máxima más rápido) que las insulinas de acción rápida solas y comienzan a controlar los niveles de glucosa más rápido que las insulinas de acción rápida solas. Esta velocidad de absorción y de aparición de la acción aumentada reduce el retraso entre la acción de la insulina y el control y registro de la glucosa, dando como resultado un sistema de bucle cerrado más eficaz que puede controlar más estrechamente los niveles de glucosa en sangre, reduciendo los picos glucémicos.

Los sistemas de bucle cerrado se conocen bien en la técnica y se han descrito en otras partes, incluyendo, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.279.543, 5.569.186, 6.558.351, 6.558.345, 6.589.229, 6.669.663, 6.740.072, 7.267.665 y 7.354.420, que se incorporan en el presente documento por referencia. Estos sistemas y otros similares, fácilmente identificables por un experto en la materia, pueden usarse para administrar las coformulaciones proporcionadas en el presente documento. Los sistemas de bucle cerrado incluyen un sistema de sensor para medir los niveles de glucosa en sangre, un controlador y un sistema de administración. Este sistema integrado está diseñado para imitar a una célula beta pancreática (célula β), de tal forma que controla un dispositivo de infusión para administrar insulina a un sujeto en un perfil de concentración similar al que podría crearse por células β humanas completamente funcionales cuando responden a cambios en las concentraciones de glucosa en sangre en el organismo. Por lo tanto, el sistema simula la respuesta de insulina natural del organismo a los niveles de glucosa y no solo hace un uso eficaz de la insulina, sino que también contribuye a otras funciones corporales también ya que la insulina tiene efectos tanto metabólicos como mitogénicos. Además, el control glucémico logrado usando un sistema de bucle cerrado se logra sin necesitar cualquier información acerca del tamaño y momento de una comida, u otros factores. El sistema puede basarse únicamente en las mediciones de glucosa en tiempo real. El sensor de glucosa genera una señal de sensor representativa de los niveles de glucosa en sangre en el cuerpo, y proporciona la señal del sensor al controlador. El controlador recibe la señal del sensor y genera órdenes que se comunican al sistema de administración de insulina. El sistema de administración de insulina recibe las órdenes e infunde insulina al organismo en respuesta a las órdenes. A continuación se proporcionan descripciones de componentes ejemplares de sistemas de bucle cerrado que pueden usarse para administrar las coformulaciones de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano proporcionada en el presente documento. Se entiende que un experto en la materia puede identificar fácilmente sistemas de bucle cerrado adecuados para su uso con las coformulaciones. Dichos análisis se han descrito en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, aquellos descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.279.543, 5.569.186, 6.558.351, 6.558.345, 6.589.229, 6.669.663, 6.740.072, 7.267.665 y 7.354.420. Los componentes individuales de los sistemas también se han descrito en la técnica, individualmente y en el contexto de sistemas de bucle cerrado para su uso en conseguir el control

glucémico. Se entiende que los ejemplos proporcionados en el presente documento son solo ejemplares, y que pueden usarse otros sistemas de bucle cerrado o componentes individuales para administrar las coformulaciones proporcionadas en el presente documento.

5 Los sistemas de bucle cerrado contienen un sensor o monitor de glucosa que funciona de manera continua. Dichos dispositivos pueden contener sensores de tipo aguja que se insertan debajo de la piel y se unen a un pequeño transmisor que comunica los datos de glucosa por vía inalámbrica mediante telemetría de radiofrecuencia a un pequeño receptor. En algunos ejemplos, el sensor se inserta a través de la piel del sujeto usando una aguja de inserción, que se elimina y desecha una vez que el sensor se coloca en el tejido subcutáneo. La aguja de inserción
10 tiene una punta afilada y una ranura abierta para sujetar el sensor durante la inserción en la piel (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.586.553 y 5.954.643). El sensor usado en el sistema de bucle cerrado puede contener opcionalmente tres electrodos que se exponen al fluido intersticial (ISF) en el tejido subcutáneo. Los tres electrodos incluyen un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contraelectrodo que se usan para formar un circuito. Cuando se suministra el voltaje adecuado a través del electrodo de trabajo y del electrodo de
15 referencia, el ISF proporciona impedancia entre los electrodos. Una corriente de señal analógica fluye desde el electrodo de trabajo a través del organismo y hacia el contraelectrodo. El voltaje del electrodo de trabajo se mantiene generalmente a tierra, y el voltaje en el electrodo de referencia puede mantenerse a un voltaje determinado V_{set} , tal como, por ejemplo, entre 300 y 700 mV. La reacción más prominente estimulada por la diferencia de voltaje entre los electrodos es la reducción de glucosa, ya que esta reacciona en primer lugar con la enzima glucosa oxidasa (GOX) para generar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Después el H_2O_2 se reduce a agua (H_2O) y (O^-) en la superficie del electrodo de trabajo. El O^- extrae una carga positiva de los componentes eléctricos del sensor, repeliendo de este modo a un electrón y provocando un flujo de corriente eléctrica. Esto da como resultado que la señal de corriente analógica sea proporcional a la concentración de glucosa en el ISF que está en contacto con los electrodos del sensor (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 7.354.420).

25 En algunos ejemplos, se usa más de un sensor para medir la glucosa en sangre. Por ejemplo, pueden usarse sensores redundantes y puede notificarse al sujeto cuando falla un sensor mediante la electrónica del transmisor del monitor de características telemétricas. Un indicador también puede informar al sujeto de qué sensores siguen funcionando y/o del número de sensores que siguen funcionando. En otros ejemplos, las señales del sensor se combinan mediante promediación u otros medios. Además, pueden usarse diferentes tipos de sensores. Por ejemplo, pueden usarse un sensor de glucosa interno y un sensor de glucosa externo para medir la glucosa en sangre a la vez.

35 Los sensores de glucosa que pueden usarse en un sistema de bucle cerrado se conocen bien y pueden identificarse fácilmente y, opcionalmente, modificarse adicionalmente, por un experto en la materia. Los ejemplos de sensores de glucosa internos incluyen, pero sin limitación, aquellos descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.497.772, 5.660.163, 5.791.344, 5.569.186 y 6.895.265. Los ejemplos de un sensor de glucosa que usa fluorescencia es aquel descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 6.011.984. Los sistemas de sensor de glucosa también pueden usar otras tecnologías de detección, incluyendo haces de luz, conductividad, muestreo a chorro, microdiálisis, microporación, muestreo ultrasónico, iontoforesis inversa, u otro método (por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.433.197 y 5.945.676, y la Publicación Internacional de Patente WO 199929230). En algunos ejemplos, se coloca únicamente el electrodo de trabajo en el tejido subcutáneo y en contacto con el ISF, y el contraelectrodo y los electrodos de referencia se localizan externamente al organismo y en contacto con la piel. El contraelectrodo y el electrodo de referencia pueden localizarse en la superficie de una carcasa del monitor y pueden sujetarse a la piel
45 como parte de un monitor de características telemétricas. En ejemplos adicionales, el contraelectrodo y el electrodo de referencia se sujetan en la piel usando otros dispositivos, tales como colocando un alambre en los electrodos y sujetando los electrodos con cinta en la piel, incorporando los electrodos en la superficie inferior de un reloj en contacto con la piel. Además, puede colocarse más de un electrodo de trabajo en el tejido subcutáneo para redundancia. También puede recogerse fluido intersticial del cuerpo de un sujeto y hacerse fluir sobre un sensor externo que no está implantado en el organismo.

50 El controlador recibe datos de entrada del sensor de glucosa. El controlador está diseñado para modelar una célula beta pancreática (célula β) y proporcionar órdenes al dispositivo de administración de insulina para infundir la cantidad requerida de insulina para el control glucémico. El controlador utiliza programas informáticos con algoritmos para calcular la cantidad necesaria de insulina basándose en los niveles de glucosa detectados por el sensor de glucosa. Los algoritmos ejemplares incluyen aquellos que modelan estrechamente a las células β , ya que los algoritmos que están diseñados para minimizar los picos de glucosa en el organismo, independientemente de cuánta insulina se administre, puede provocar un aumento de peso excesivo, hipertensión, y aterosclerosis. Típicamente, el sistema está previsto para emular el patrón de secreción de insulina *in vivo* y para ajustar este patrón de manera consistente a la adaptación de las células β *in vivo* experimentada por los individuos sanos normales. Los algoritmos de control útiles para sistema de bucle cerrado incluyen aquellos utilizados por un controlador proporcional-integral-derivativo (PID). También pueden usarse algoritmos controladores proporcionales derivativos y de modelo de control predictivo en algunos sistemas (Hovorka et al. (2006) *Diabetic Med.* 23:1-12). Los algoritmos ejemplares incluyen, pero sin limitación, aquellos descritos en Hovorka et al. (*Diabetic Med.* (2006) 23:1-12), Shimoda et al., (*Front Med Biol Eng* (1997) 8:197-211), Shichiri et al. (*Artif. Organs* (1998) 22:32-42), Steil et al. (*Diabetes Technol Ther* (2003) 5: 953- 964), Kalatz et al., (*Acta Diabetol.* (1999) 36:215) y las Patentes de Estados Unidos n.º 5.279.543, 5.569.186,

6.558.351, 6.558.345, 6.589.229, 6.740.042, 6.669.663, 6.740.072, 7.267.665 y 7.354.420 y la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20070243567.

5 En un ejemplo, se utiliza un controlador PID en el sistema de bucle cerrado. Un controlador PID ajusta continuamente la infusión de insulina evaluando los picos de glucosa desde tres puntos de vista: el distanciamiento respecto de la glucosa diana (el componente proporcional), el área bajo la curva entre la glucosa ambiental y diana (el componente integral), y el cambio en la glucosa ambiental (el componente derivativo). En general, la respuesta *in vivo* de las células β a cambios en glucosa se caracteriza por respuestas de insulina de "primera" y de "segunda" fase. Puede imitarse la respuesta bifásica de insulina de una célula β usando componentes de un controlador
10 proporcional, más integral, más derivativo (PID) (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 7.354.420).

El controlador genera órdenes para la administración de insulina deseada. Los sistemas de administración de insulina, tales como bombas de insulina, se conocen en la técnica y pueden usarse en los sistemas de bucle cerrado. Los dispositivos de administración de insulina ejemplares (tales como aquellos descritos anteriormente)
15 incluyen, pero sin limitación, aquellos descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.562.751, 4.678.408, 4.685.903, 4.373.527, 4.573.994, 6.554.798, 6.641.533, 6.744.350, 6.852.104, 6.872.200, 6.936.029, 6.979.326, 6.999.854, 7.025.743 y 7.109.878. Los dispositivos de administración de insulina contienen típicamente uno o más depósitos, que generalmente son desechables, que contienen una preparación de insulina, tal como una coformulación de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano del presente documento.
20 En algunos ejemplos, las coformulaciones se administran usando un tubo de infusión y una cánula o aguja. En otros ejemplos, el dispositivo de infusión se acopla directamente a la piel y las coformulaciones fluyen a partir del dispositivo de infusión, a través de una cánula o aguja directamente en el organismo sin el uso de un tubo. En ejemplos adicionales, el dispositivo de infusión es interno en el organismo y puede usarse un tubo de infusión para administrar las coformulaciones. Los sistemas de bucle cerrado también pueden contener componentes adicionales,
25 incluyendo, pero sin limitación, filtros, calibradores y transmisores.

H. MÉTODOS PARA PRODUCIR ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN UNA INSULINA O UNA ENZIMA DEGRADANTE DE HIALURONANO Y POLIPÉPTIDOS DE LOS MISMOS

30 Los polipéptidos de una insulina y una enzima degradante de hialuronano expuestos en el presente documento pueden obtenerse mediante métodos bien conocidos en la técnica para purificación de proteínas y expresión de proteínas recombinantes. Los polipéptidos también pueden sintetizarse químicamente. Por ejemplo, la cadena A y la cadena B de insulina pueden sintetizarse químicamente y después reticularse mediante enlaces disulfuro mediante, por ejemplo, una reacción de reducción-oxidación. Cuando los polipéptidos se producen por medios recombinantes,
35 puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la materia para la identificación de ácidos nucleicos que codifican los genes deseados. Puede usarse cualquier método disponible en la técnica para obtener un ADNc o un clon de ADN genómico de longitud completa (es decir, que abarca la región codificante completa) que codifica una hialuronidasa, tal como a partir de una célula o fuente de tejido. Las insulinas o enzimas degradantes de hialuronano modificadas o variantes pueden diseñarse por ingeniería genética a partir de un polipéptido de tipo silvestre, tal como mediante mutagénesis de sitio dirigido.
40

Los polipéptidos pueden clonarse o aislarse usando cualquier método disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Dichos métodos incluyen amplificación PCR de ácidos nucleicos y exploración de bibliotecas, incluyendo exploración de ácidos nucleicos e hibridación, exploración basada en anticuerpos y
45 exploración basada en la actividad.

Los métodos para la amplificación de ácidos nucleicos pueden usarse para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido deseado, incluyendo, por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Puede usarse un material que contiene ácido nucleico como material de partida a partir del cual puede aislarse una molécula de ácido nucleico codificante de un polipéptido. Por ejemplo, pueden usarse preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos tisulares, muestras de fluido (por ejemplo, sangre, suero, saliva), y muestras de sujetos sanos y/o enfermos en los métodos de amplificación. También pueden usarse bibliotecas de ácido nucleico como fuente de material de partida. Pueden diseñarse cebadores para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores basándose en secuencias expresadas a partir de las cuales se genera un polipéptido deseado. Pueden diseñarse cebadores basándose en la retrotraducción de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Las moléculas de ácido nucleico generadas mediante amplificación pueden secuenciarse y confirmarse que codifican un polipéptido deseado.
50
55

Pueden unirse secuencias de nucleótidos adicionales a una molécula de ácido nucleico codificante de un polipéptido, incluyendo secuencias enlazadoras que contienen sitios de endonucleasas de restricción con el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN que codifican la proteína núcleo. Además, pueden unirse operativamente secuencias de nucleótidos adicionales especificando elementos de ADN funcionales a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteínas extracelulares, y secuencias de secreción, por ejemplo, secuencias de señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Dichas secuencias son
60
65

conocidas para los expertos en la materia. También pueden unirse secuencias de restos de nucleótidos adicionales, tales como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteína a las moléculas de ácido nucleico que codifican una enzima. Dichas regiones incluyen, pero sin limitación, secuencias de restos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la captación de una enzima en células diana específicas, o de otro modo alterar la farmacocinética de un producto de un gen sintético. Por ejemplo, las enzimas pueden unirse a restos de PEG.

Además, pueden añadirse marcadores u otros restos, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, también pueden unirse secuencias de restos de nucleótidos adicionales, tales como secuencias de bases que especifican un marcador epitópico u otro marcador detectable a las moléculas de ácido nucleico que codifican una enzima. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican un marcador His (por ejemplo, 6xHis, HHHHHH; SEQ ID NO: 54) o marcador Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 55).

Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden entonces insertarse en un vector de clonación adecuado. Puede usarse un gran número de sistemas de vector-hospedador conocidos en la técnica. Los vectores posibles incluyen, pero sin limitación, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector tiene que ser compatible con la célula hospedadora usada. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, bacteriófagos, tales como derivados de lambda, o plásmidos, tales como pCMV4, pBR322 o derivados de plásmidos pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ejemplificado en el presente documento. La inserción en un vector de clonación puede, por ejemplo, efectuarse ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene extremos cohesivos complementarios. La inserción puede efectuarse en vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, pueden modificarse enzimáticamente los extremos de las moléculas de ADN. Como alternativa, puede producirse cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los extremos del ADN; estos enlazadores ligados pueden contener oligonucleótidos específicos sintetizados químicamente que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En un método alternativo, pueden modificarse el vector escindido y el gen de la proteína mediante colas homopoliméricas. Las moléculas recombinantes pueden introducirse en células hospedadoras mediante, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de tal forma que se generan muchas copias de la secuencia del gen.

La insulina puede producirse usando una diversidad de técnicas (véase, por ejemplo, Ladisch et al. (1992) *Biotechnol. Prog.* 8:469-478). En algunos ejemplos, se inserta el ácido nucleico que codifica un polipéptido de preproinsulina o proinsulina en un vector de expresión. Tras la expresión, el polipéptido de preproinsulina o proinsulina se convierte en insulina mediante métodos enzimáticos o químicos que escinden la secuencia de señal y/o el péptido C, dando como resultado que las cadenas A y B se reticulen mediante enlaces disulfuro a través, por ejemplo, de una reacción de reducción oxidación (véase, por ejemplo, Cousens et al., (1987) *Gene* 61:265-275, Chance et al., (1993) *Diabetes Care* 4:147-154). En otro ejemplo, se insertan los ácidos nucleicos que codifican la cadena A y la cadena B de una insulina en uno o dos vectores de expresión para la coexpresión en forma de un solo polipéptido a partir de un vector de expresión o su expresión en forma de dos polipéptidos a partir de uno o dos vectores de expresión. Por lo tanto, los polipéptidos de cadena A y B pueden expresarse por separado y después combinarse para generar una insulina, o pueden coexpresarse, en ausencia de una cadena C. En los casos donde las cadenas A y B se coexpresan como un solo polipéptido, el ácido nucleico que codifica las subunidades también puede codificar un enlazador o espaciador entre la cadena B y la cadena A, tal como un enlazador o espaciador descrito anteriormente. El ácido nucleico insertado en el vector de expresión puede contener, por ejemplo, ácido nucleico que codifica la cadena B de insulina, un enlazador, tal como, por ejemplo, un enlazador de alanina-alanina-lisina, y la cadena A, dando como resultado la expresión de, por ejemplo, "cadena B de insulina-Ala-Ala-Lys-cadena A de insulina".

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

1. Vectores y células

Para la expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, tales como cualquiera descrita en el presente documento, puede insertarse el ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína en un vector de expresión adecuado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteína insertada. También pueden suministrarse las señales transcripcionales y traduccionales necesarias por los genes promotores nativos para la enzima, 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 cualesquiera adecuados para su uso en las mismas.

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

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

15 Puede usarse una diversidad de sistemas hospedador-vector para expresar la secuencia codificante de proteína. Estos incluyen, pero sin limitación, sistemas de células de mamífero infectados con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus u otros virus); sistemas de células de insecto infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos, tales como levaduras que contienen vectores de levaduras; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN de plásmido, o ADN de cósmido. Los elementos de expresión de los vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema hospedador-vector usado, puede usarse uno cualquiera de una serie de elementos de transcripción y traducción adecuados.

25 Puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la materia 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 transcripcional/traduccionales y secuencias codificantes de proteína adecuadas. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante y sintéticas *in vitro* y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de las mismas, pueden regularse por una segunda secuencia de ácido nucleico de tal forma que los genes o fragmentos de las mismas se expresan en un hospedador transformado con la molécula (o las 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 pueden usarse incluyen, pero sin limitación, 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 timidina cinasa de herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982)); vectores de expresión procariotas, tales como el promotor de β -lactamasa (Jay et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543) o el promotor *tac* (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242:74-94 (1980); vectores de expresión en plantas que contienen el promotor de nopalina sintetasa (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213 (1984)) o el promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., Nature 310:115-120 (1984)); elementos promotores de levaduras y otros hongos, tales como el promotor Gal4, el promotor de alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol cinasa, el promotor de fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional animales que muestran especificidad de tejido y que se han usado en animales transgénicos: 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)); región de control génico de insulina que es activa en las células beta pancreáticas (Hanahan et al., Nature 315:115-122 (1985)), región de control génico 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)), región de control del virus de tumor mamario de ratón que es activo en células testiculares, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder et al., Cell 45:485-495 (1986)), región de control génica de albúmina, que es activa en hígado (Pinkert et al., Genes and Devel. 1:268-276 (1987)), región de control génico de alfa-fetoproteína, que es activa en el hígado (Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235:53-58 (1987)), región de control génico de alfa-1 antitripsina, que es activa en el hígado (Kelsey et al., Genes and Devel. 1:161-171 (1987)), región de control génico de beta globina, que es activa en células mieloides (Magram et al., Nature 315:338-340 (1985); Kollias et al., Cell 46:89-94 (1986)), región de control génica de proteína básica de mielina, que es activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead et al., Cell 48:703-712 (1987)), región de control génico de la cadena ligera 2 de miosina, que es activa en músculo esquelético (Shani, Nature 314:283-286 (1985)), y región de control génico de la hormona liberadora gonadotrópica, que es activa en gonadótrofos del hipotálamo (Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986)).

65 En una realización específica, se usa un vector que contiene un promotor unido operativamente a ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo de los mismos, o uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a

antibióticos). Los vectores de plásmidos ejemplares para la transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles a través de Qiagen, Valencia, CA; véase también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor T5 de fago (reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión de operador lac doble para proporcionar la expresión estrechamente regulada de alto nivel de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión ribosomal sintético (RBS II) para una traducción eficaz, una secuencia codificante del marcador 6xHis, terminadores transcripcionales t_0 y T1, el origen de replicación ColE1, y un gen de beta lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de un marcador 6xHis en uno de los extremos N o C terminales de la proteína recombinante. Dichos plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para todas las tres fases de lectura y proporcionan la expresión de proteínas marcadas con 6xHis en N-terminal. Otros vectores de plásmidos ejemplares para la transformación de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase la patente de Estados Unidos 4.952.496; disponible a través de Novagen, Madison, WI; véase también la bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, el terminador T7, el operador lac inducible de *E. coli*, y el gen represor de lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, el terminador T7, y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (Novagen, Madison, WI), que contiene una secuencia líder de 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 expresión en células de mamífero es el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 se derivó del armazón del vector pCI (Promega). Contiene ADN que codifica el gen de resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación F1, una región potenciadora/promotora inmediata-temprana de citomegalovirus (CMV), y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El vector de expresión también tiene un sitio de entrada a ribosoma interno (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón.

2. Restos enlazadores

En algunos ejemplos, la insulina se prepara generando los polipéptidos de cadena A y de cadena B con un enlazador, de tal forma, por ejemplo, que el extremo C-terminal de la cadena B se une al extremo N-terminal de la cadena A por un enlazador corto. La cadena A y la cadena B pueden expresarse a partir de un solo polipéptido que contiene un enlazador, o pueden expresarse por separado y después unirse por un enlazador. El resto enlazador se selecciona dependiendo de las propiedades deseadas. El resto enlazador debe ser lo suficientemente largo y lo suficientemente flexible para permitir que la cadena A y la cadena B imiten la conformación natural de la insulina.

Los enlazadores pueden ser cualquier resto adecuado para la cadena A y la cadena B de insulina. Dichos restos incluyen, pero sin limitación, enlaces peptídicos; aminoácidos y enlaces peptídicos, que contienen típicamente entre uno y aproximadamente 60 aminoácidos; enlazadores químicos, tales como reticulantes escindibles heterobifuncionales, enlazantes fotoescindibles y enlazantes escindibles con ácido.

Los restos enlazadores pueden ser péptidos. El enlazador peptídico tiene típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 60 restos de aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 40, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 restos de aminoácidos. Los enlazadores peptídicos pueden codificarse convenientemente por ácidos nucleicos e incorporarse en proteínas de fusión tras la expresión en una célula hospedadora, tal como *E. coli*. En un ejemplo, un enlazador alanina-alanina-lisina (AAK) (SEQ ID NO: 178) está codificado en un ácido nucleico entre el ácido nucleico que codifica la cadena B de insulina y el ácido nucleico que codifica la cadena A, de tal forma que tras la expresión, se produce un polipéptido de "cadena B de insulina-AAK-cadena A de insulina". Los enlazadores peptídicos pueden ser una secuencia de aminoácidos espaciadora flexible, tales como aquellos conocidos en investigación de anticuerpos monocatenarios. Los ejemplos de dichos restos enlazadores conocidos incluyen, pero sin limitación, RPPPPC (SEQ ID NO: 166) o SSPPPPC (SEQ ID NO: 167), GGGGS (SEQ ID NO: 168), (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 169), GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 170), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 711), GSTSGSGKSSEGSG- STKG (SEQ ID NO: 172), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 173), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 174), EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 175), SRSSG (SEQ ID NO: 176) y SGSSC (SEQ ID NO: 177).

Como alternativa, el resto enlazador peptídico puede ser VM (SEQ ID NO: 179) o AM (SEQ ID NO: 180), o tienen la estructura descrita por la fórmula: AM(G_{2to4}S)_xAM en donde X es un número entero de 1 a 11 (SEQ ID NO: 181). Los restos enlazadores adicionales se describen, por ejemplo, en Huston et al.(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883; Whitlow, M., et al., (1993) Protein Engineering 6:989-995; Newton et al. (1996) Biochemistry 35:545-553; A. J. Cumber et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:397-401; Ladurner et al. (1997) J. Mol. Biol. 273:330-337; y la Patente de los Estados Unidos n.º 4.894.443.

En algunos ejemplos, los enlazadores peptídicos están codificados por un ácido nucleico y se incorporan entre la cadena B y la cadena A tras la expresión en una célula hospedadora, tal como *E. coli* o *S. cerevisiae*. En otros ejemplos, se sintetiza un enlazador peptídico mediante métodos químicos. Esto puede llevarse a cabo en un protocolo separado para la síntesis de uno o más de la cadena A y B, tras lo cual se unen los componentes, tal como

mediante el uso de enlazadores heterobifuncionales. Como alternativa, puede sintetizarse un enlazador peptídico en el extremo N o C-terminal de una de las cadenas de insulina, que después se une a la otra cadena a través del enlazador peptídico, tal como con un enlazador heterobifuncional.

5 Puede usarse cualquier enlazador conocido para los expertos en la materia para unir la cadena A y la cadena B de insulina. Los enlazadores y enlaces que son adecuados para unir químicamente las cadenas incluyen, pero sin limitación, enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces disulfuro impedidos, y enlaces covalentes entre los grupos reactivos libres, tales como grupos amina y tiol. Estos enlaces se producen usando reactivos heterobifuncionales para producir grupos tiol reactivos en uno o ambos de los polipéptidos y después haciendo reaccionar los grupos tiol en un polipéptido con grupos tiol o grupos amina reactivos a los que pueden unirse grupos maleimido o grupos tiol reactivos en el otro. Otros enlazadores incluyen enlazadores escindibles por ácido, tales como bismaleimidoetoxi propano, conjugados de transferrina lábiles a ácido y dihidrazida de ácido adípico, que podría escindir en compartimentos intracelulares más ácidos; los reticulantes que se escinden tras la exposición a luz UV o visible y enlazadores, tales como los diversos dominios, tales como CH1, CH2, y CH3, de la región constante de IgG1 humana (véase Batra et al. (1993) *Molecular Immunol.* 30:379-386). En algunas realizaciones, pueden incluirse varios enlazadores para aprovechar las propiedades deseadas de cada enlazador. Los enlazadores químicos y los enlazadores peptídicos pueden insertarse acoplado covalentemente el enlazador a la cadena A o la cadena B de insulina. Los agentes heterobifuncionales, descritos más adelante, pueden usarse para efectuar dicho acoplamiento covalente. Los enlazadores peptídicos pueden unirse expresando ADN que codifica el enlazador entre la cadena B y la cadena A.

Otros enlazadores que pueden usarse para unir la cadena A y la cadena B de insulina incluyen: sustratos enzimáticos, tales como sustrato de catepsina B, sustrato de catepsina D, sustrato de tripsina, sustrato de trombina, sustrato de subtilisina, sustrato de Factor Xa, y sustrato de enterocinasa; los enlazadores que aumentan la solubilidad, flexibilidad, y/o capacidad de escisión intracelular incluyen enlazadores, tales como $(\text{gly}_m\text{ser})_n$ y $(\text{ser}_m\text{gly})_n$, en los que m es de 1 a 6, preferentemente de 1 a 4, más preferentemente de 2 a 4, y n es de 1 a 30, preferentemente de 1 a 10, más preferentemente de 1 a 4 (véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional PCT n.º WO 96/06641, que proporciona enlazadores ejemplares). En algunas realizaciones, pueden incluirse varios enlazadores para aprovechar las propiedades deseadas de cada enlazador.

30

3. Expresión

Los polipéptidos de insulina y enzima degradante de hialuronano pueden producirse mediante cualquier método conocido para los expertos en la materia incluyendo métodos *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas deseadas pueden expresarse en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas necesarias de las proteínas, tales como, por ejemplo, necesarias para la administración y tratamiento. Los hospedadores de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas, tales como *E. coli*, levaduras, plantas, células de insecto, células de mamífero, incluyendo líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los hospedadores 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 de hospedadores de expresión puede efectuarse basándose en estos y otros factores, tales como consideraciones regulatorias y de seguridad, costes de producción y de la necesidad y métodos de purificación.

Hay disponibles muchos vectores de expresión y son conocidos para los expertos en la materia y pueden usarse para la expresión de proteínas. La elección del vector de expresión se verá influenciada por la elección del sistema de expresión hospedador. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente potenciadores, señales traduccionales, y señales de terminación transcripcional y traduccional. Los vectores de expresión que se usan para la transformación estable tienen típicamente un marcador de selección que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, puede usarse un origen de replicación para amplificar el número de copias del vector.

Los polipéptidos de hialuronidasa soluble también pueden utilizarse o expresarse como fusiones de proteínas. Por ejemplo, puede generarse una fusión de enzimas para añadir funcionalidad adicional a una enzima. Los ejemplos de proteínas de fusión de enzimas incluyen, pero sin limitación, fusiones de una secuencia de señal, un marcador para localización, por ejemplo, un marcador *his*₆ o un marcador *myc*, o un marcador para purificación, por ejemplo, una fusión de GST, y una secuencia para dirigir la secreción de proteínas y/o la asociación a membrana.

a. Células procariotas

60 Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de proteínas. La transformación de *E. coli* es una técnica simple y rápida bien conocida para los expertos en la materia. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles, dichos promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que muestran cierta toxicidad para las células hospedadoras. 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.

65

Las proteínas, tales como cualquiera proporcionada en el presente documento, pueden expresarse en el ambiente citoplásmico de *E. coli*. El citoplasma es un ambiente reductor y para algunas moléculas, esto puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Los agentes reductores, tales como ditreitilo y β -mercaptoetanol y desnaturizantes, tales como guanidina-HCl y urea pueden usarse para resolubilizar las proteínas.

5 Una estrategia alternativa es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias que proporciona un ambiente oxidante e isomerasas similares a chaperoninas y de disulfuro y puede dar lugar a la producción de proteína soluble. Típicamente, se fusiona una secuencia líder a la proteína que se va a expresar, lo que dirige la proteína al periplasma. Entonces se elimina el líder mediante peptidasas de señal dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias líder de direccionamiento periplásmico incluyen el líder pelB del gen de peptidato liasa y el líder derivado del gen de 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 a partir del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no se secretan pueden obtenerse del periplasma mediante lisis osmótica. De manera similar a la expresión citoplasmática, en algunos casos las proteínas pueden hacerse insolubles y pueden usarse desnaturizantes y agentes reductores para facilitar la solubilización y el plegado.

10

15 temperatura de inducción y cultivo también puede influenciar los niveles de expresión y la solubilidad, típicamente, se usan temperaturas entre 25 °C y 37 °C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglucosiladas. Por lo tanto, si las proteínas requieren de glucosilación para su función, la glucosilación puede añadirse *in vitro* después de la purificación de las células hospedadoras.

20 b. Células de levadura

Las levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son hospedadores de expresión de levadura bien conocidos que pueden usarse para la producción de proteínas, tales como cualquiera descrita en el presente documento. Las levaduras pueden transformarse con vectores de replicación episómicos o mediante integración cromosómica estable mediante recombinación de homólogos. Típicamente, se usan promotores inducibles para regular la expresión génica. Los ejemplos de dichos promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneína, tales como CUP1, AOX1 u otros promotores de *Pichia* u otras levaduras. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador de selección, tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para la selección y 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 levaduras pueden dirigirse para su secreción usando fusiones de péptido de señal, tales como la señal de secreción de factor de tipo alfa de emparejamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de la superficie celular de levaduras, tales como el receptor de adhesión de emparejamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adenivorans*. Puede diseñarse 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 capaz de glucosilación en los motivos Asn-X-Ser/Thr.

25

30

35

40 c. Células de insecto

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

45

50

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

55

60

d. Células de mamífero

Los sistemas de expresión de mamífero pueden usarse para expresar proteínas, incluyendo polipéptidos de hialuronidasa solubles. Las construcciones de expresión pueden transferirse a células de mamífero mediante infección vírica, tal como adenovirus o mediante transferencia directa de ADN, tal como liposomas, fosfato de calcio,

65

DEAE-dextrano y mediante medios físicos, tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero incluyen típicamente un sitio de protección de ARNm, una caja TATA, una secuencia de inicio traduccional (secuencia consenso Kozak) y elementos de poliadenilación. También pueden añadirse elementos IRES para permitir la expresión bicistónica con otro gen, tal como un marcador de selección. Dichos

5 vectores incluyen a menudo promotores-potenciadores transcripcionales para expresión de alto nivel, por ejemplo, el promotor-potenciador de SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV) humano y la repetición larga terminal del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores-potenciadores son activos en muchos tipos celulares. Las regiones promotoras y potenciadoras de tejido y tipo celular pueden usarse para expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ejemplares incluyen, pero sin limitación, aquellos de genes tales como elastasa I, insulina,

10 inmunoglobulina, virus del tumor mamario de ratón, albúmina, alfa fetoproteína, alfa1-antitripsina, beta globina, proteína básica de mielina, cadena ligera 2 de miosina, y control génico de hormona liberadora gonadotrópica. Pueden usarse marcadores de selección para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Los ejemplos de genes marcadores de selección incluyen, pero sin limitación, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforibosil transferasa, aminoglucósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa

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

20 Hay muchas líneas celulares disponibles para la expresión en mamíferos, incluyendo células de ratón, rata, humano, mono, pollo y hámster. Las líneas celulares ejemplares incluyen, pero sin limitación, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretoras) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, documento Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8, y células HKB. También hay líneas celulares adaptadas para medios sin suero, lo que facilita la purificación de las proteínas secretadas del medio de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, n.º de cat. 11619-012) y la línea celular EBNA-1 sin suero (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42.). También hay líneas celulares que están adaptadas para crecer en medios especiales optimizados para expresión máxima. Por ejemplo, las células CHO DG44 están adaptadas para crecer en cultivo en suspensión en un medio químicamente definido libre de

25 productos animales.

30 e. Plantas

Pueden usarse células vegetales y plantas transgénicas para expresar proteínas, tales como cualquiera descrita en el presente documento. Las construcciones de expresión se transfieren típicamente a plantas usando transferencia de ADN directa, tal como con 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 transcripcional y elementos de control traduccional. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación se dividen normalmente entre hospedadores de dicotiledóneas, tales como *Arabidopsis* y tabaco, y hospedadores de monocotiledónea, tales como maíz y arroz. Los ejemplos de

35 promotores vegetales usados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de ribosa bifosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. A menudo se usan marcadores de selección, tales como higromicina y fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa para facilitar la selección y el mantenimiento de células transformadas. Las células vegetales transformadas se mantienen en cultivo como células, agregados (tejido calloso) o se regeneran en plantas completas. Las células vegetales transgénicas pueden incluir algas diseñadas para producir polipéptidos de hialuronidasa. Debido a que las plantas tienen patrones de glucosilación diferentes a las células de mamífero, esto puede influenciar la selección de proteínas producidas en estos hospedadores.

40 4. Técnicas de purificación

50 El método para la purificación de polipéptidos, incluyendo polipéptidos de insulina y enzima degradante de hialuronano u otras proteínas, a partir de las células hospedadoras dependerá de las células hospedadoras y sistemas de expresión seleccionados. Para moléculas secretadas, las proteínas se purifican generalmente a partir del medio de cultivo después de retirar las células. Para expresión intracelular, las células pueden lisarse y purificarse las proteínas a partir del extracto. Cuando se usan organismos transgénicos, tales como plantas y animales transgénicos para la expresión, pueden usarse tejidos u órganos como material de partida para producir un extracto celular lisado. Además, la producción de animal transgénico puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que pueden recogerse, y en caso necesario, pueden extraerse las proteínas y purificarse adicionalmente usando métodos estándar en la técnica.

60 Las proteínas, tales como polipéptidos de insulina o polipéptidos de enzima degradante de hialuronano, pueden purificarse usando técnicas de purificación de proteínas estándar, incluyendo, pero sin limitación, SDS-PAGE, fraccionamiento por tamaño y cromatografía de exclusión por tamaño, precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como cromatografía de intercambio aniónico. También pueden utilizarse técnicas de purificación de afinidad para mejorar la eficacia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a enzimas hialuronidasas en la purificación de

65

afinidad. También pueden diseñarse construcciones de expresión para añadir un marcador de afinidad a una proteína, tal como un epítipo de myc, fusión de GST o His₆ y purificarse por afinidad con anticuerpo de myc, resina de glutatión y Ni-resina, respectivamente. La pureza puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo electroforesis en gel, métodos HPLC ortogonales, tinción y técnicas espectrofotométricas.

5

I. Métodos para evaluar la estabilidad y la actividad

Pueden usarse ensayos para evaluar la estabilidad de las formulaciones o coformulaciones proporcionadas en el presente documento, incluyendo coformulaciones que contienen una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano proporcionadas en el presente documento. Dichos ensayos pueden evaluar la estabilidad y actividad de la enzima degradante de hialuronano y/o la estabilidad, actividad y solubilidad de la insulina de acción rápida en las coformulaciones. Dichos ensayos pueden usarse, por ejemplo, para determinar la estabilidad de las coformulaciones a lo largo del tiempo a temperaturas y condiciones de almacenamiento particulares, evaluando la actividad, solubilidad, y estabilidad (por ejemplo, la formación de agregados, etc.) antes de su almacenamiento y después en varios instantes posteriores. Los ensayos también pueden usarse para efectuar ajustes menores a las formulaciones proporcionadas en el presente documento a la vez que se mantiene la estabilidad de ambos agentes activos.

10

15

1. Insulina

20

La estabilidad y solubilidad de las coformulaciones de insulina proporcionadas en el presente documento puede evaluarse usando métodos y ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede evaluarse la estabilidad y solubilidad de la insulina mediante evaluación visual, clarificación de ácido, microscopía óptica, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC), bioensayos *in vivo* y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) no desnaturalizante. En un ejemplo, la solubilidad y estabilidad de la insulina se determina mediante evaluación visual, incluyendo cambios en el color, claridad, presencia de agregados o aglutinación y adhesión de material, o congelación, al vaso que contiene las coformulaciones proporcionadas en el presente documento. Los cambios visuales se confirman mediante aclaramiento de ácido, en donde la ausencia de disolución después de la acidificación confirma la presencia de insulina desnaturalizada insoluble en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento. Los cambios visuales en la insulina en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento también pueden confirmarse mediante microscopía óptica y/o micrografía mediante retroiluminación fluorescente. La solubilidad aparente de una insulina de acción rápida en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento puede evaluarse, por ejemplo, mediante RP-HPLC, tal como se describe en el ejemplo 3. En los métodos expuestos en el ejemplo 3, la solubilidad aparente se mide como el porcentaje de recuperación de insulina después de su almacenamiento en varias condiciones e instantes. El porcentaje de recuperación se determina en comparación con una muestra de referencia. Además, los productos de degradación de insulina, tales como desamido insulina, pueden determinarse mediante RP-HPLC. En un ejemplo, la estabilidad de la insulina en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento se evalúa midiendo la formación de agregados usando cromatografía de exclusión por tamaño (véase, por ejemplo, el ejemplo 4). En este ejemplo, la SEC se usa para determinar la presencia de proteínas de alto peso molecular, es decir, agregados.

25

30

35

40

La actividad de insulina también puede evaluarse usando métodos y ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de una insulina, incluyendo composiciones y coformulaciones de insulina, para actuar como un agente terapéutico puede evaluarse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* bien conocidos en la técnica para evaluar la capacidad de una insulina para unirse al receptor de insulina. En un ejemplo, se lleva a cabo un ensayo de unión competitivo en el que se preparan membranas de células placentarias humanas como fuente de receptores de insulina y se incuban con insulina radiomarcada con o sin el análogo de insulina sin marcar. La cantidad de insulina radiomarcada unida se detecta entonces para determinar la capacidad del análogo de insulina para competir por la unión y se calcula la afinidad relativa del análogo de insulina por el receptor de insulina placentario (véase, por ejemplo, Weiss et al., (2001) J. Biol. Chem. 276:40018-40024). Otras fuentes de receptores de insulina, incluyendo otras células que expresan de manera natural o recombinante el receptor de insulina, pueden usarse también en dichos ensayos de unión competitiva (Duttaroy et al., (2005) Diabetes 54:251-258).

45

50

La capacidad de la insulina para estimular la captación de glucosa o efectuar cualquier otro de sus resultados metabólicos puede evaluarse *in vitro*. Para medir la captación de glucosa estimulada por insulina, se incuban los adipocitos con glucosa marcada, tal como 2-desoxi-D-[2,6-³H]glucosa o D- [U-¹⁴C]glucosa con o sin insulina. Entonces se mide la radiactividad incorporada para determinar la cantidad de captación de glucosa en presencia o ausencia de insulina (Luveau et al., (2004) J Endocrin. 181:271-280, Duttaroy et al., (2005) Diabetes 54:251-258). Cuando se evalúa la actividad de un análogo de insulina, también puede evaluarse la actividad de insulina humana y usarse por comparación. También pueden efectuarse ensayos *in vitro* para evaluar la producción de glucosa en células H4IIE en presencia de insulina (Wang et al., (2000) J. Biochem., 275:14717-14721, Duttaroy et al., (2005) Diabetes 54:251-258).

55

60

También pueden llevarse a cabo estudios *in vivo* usando modelos animales o sujetos humanos diabéticos o sanos para evaluar la actividad terapéutica de la insulina, incluyendo composiciones y coformulaciones de insulina. La

65

insulina puede administrarse a modelos animales de diabetes para evaluar los efectos en los niveles de glucosa en sangre, niveles de insulina circulantes, y hemoglobina Alc (HbAlc), por ejemplo. La hemoglobina Alc se forma cuando la glucosa se une a hemoglobina, lo que sucede cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados. Los niveles de HbAlc en una muestra de sangre pueden evaluarse mediante, por ejemplo, HPLC, ELISA, RIA u otro inmunoensayo. Los valores de HbAlc para sujetos sanos son de aproximadamente el 4,0-6,2 por ciento. La American Diabetes Association recomienda que debe ser menor de 7 % (o menor del 6 % en determinadas personas) para pacientes con diabetes para ayudar a prevenir las complicaciones a causa de la diabetes. Los niveles de insulina pueden medirse mediante, por ejemplo, ELISA o RIA. Los niveles de glucosa se miden típicamente usando un sensor o analizador de glucosa.

Los modelos animales para la diabetes de tipo 1 incluyen el ratón diabético no obeso (NOD) y la rata BioBreeding (BB) (Atkinson et al., (1999) *Nature Med.* 5:601-604). Los modelos animales para la diabetes de tipo 2 incluyen, pero sin limitación, ratones ob/ob y ratones db/db, que tienen mutaciones en el gen de leptina o en el receptor de leptina, respectivamente, ratones KK, ratones Nagoya-Shibata- Yasuda (NSY), ratas Zucker diabéticas obesas (ZDF) y ratas Gato-Katazaki (GK) (Cefalu (2006) *ILAR Journal* 47:186-198). En otros ejemplos, se usan animales sanos para ensayar la actividad de una insulina, con o sin una enzima degradante de hialuronano.

2. Enzimas degradantes de hialuronano

Puede evaluarse la actividad de una enzima degradante de hialuronano usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ensayo XXII USP para hialuronidasa determina la actividad indirectamente midiendo la cantidad de ácido hialurónico no degradado, o hialuronano, (HA) restante después de que se deje reaccionar la enzima con el HA durante 30 min a 37 °C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Puede usarse una solución de patrón de referencia de hialuronidasa (USP) o un formulario nacional (NF) de patrón de hialuronidasa en un ensayo para determinar la actividad, en unidades, de cualquier hialuronidasa. En un ejemplo, la actividad se mide usando un ensayo de microturbidez. Esto se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une a la albúmina de suero. La actividad se mide incubando hialuronidasa con hialuronato sódico (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo determinado (por ejemplo, 10 minutos) y después precipitando el hialuronato sódico no digerido con la adición de albúmina de suero acidificada. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un periodo de revelado adicional. La reducción en la turbidez resultante de la actividad de la hialuronidasa en el sustrato de hialuronato sódico es una medida de la actividad enzimática de la hialuronidasa (véase, por ejemplo, el ejemplo 2).

En otro ejemplo, la actividad de hialuronidasa se mide usando un ensayo de microtitulación en el que se mide el ácido hialurónico biotinilado residual después de incubación con hialuronidasa (véase, por ejemplo, Frost y Stern (1997) *Anal. Biochem.* 251:263-269, Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20050260186). Los grupos carboxilo libres en los restos de ácido glucurónico del ácido hialurónico se biotinilan, y se acopla covalentemente el sustrato de ácido hialurónico biotinilado a una placa de microtitulación. Después de la incubación con hialuronidasa, se detecta el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual usando una reacción de avidina-peroxidasa, y se comparan con el obtenido después de una reacción con patrones de hialuronidasa de actividad conocida. También se conocen en la técnica para medir la actividad de hialuronidasa y pueden usarse en los métodos en el presente documento (véase, por ejemplo, Delpech et al., (1995) *Anal. Biochem.* 229:35-41; Takahashi et al., (2003) *Anal. Biochem.* 322:257-263).

También puede evaluarse la capacidad de una enzima degradante de hialuronano para actuar como agente de diseminación o difusor. Por ejemplo, puede inyectarse el colorante trypan blue por vía subcutánea con o sin una enzima degradante de hialuronano en la piel lateral de cada lado de ratones desnudos. Entonces se mide el área coloreada, tal como con un microcalibre, para determinar la capacidad de la enzima degradante de hialuronano para actuar como agente de diseminación (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20060104968). También puede evaluarse el efecto de la coadministración de hialuronidasa con otro agente, tal como insulina, en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de ese agente *in vivo* usando un modelo animal y/o sujetos humanos, tal como en una situación de un ensayo clínico. La actividad funcional de una enzima degradante de hialuronano que no es una hialuronidasa puede compararse con una hialuronidasa usando cualquiera de estos ensayos. Esto puede efectuarse para determinar una cantidad funcionalmente equivalente de una enzima degradante de hialuronano. Por ejemplo, puede determinarse la capacidad de una enzima degradante de hialuronano para actuar como un agente difusor o de diseminación puede evaluarse inyectándolo en la piel del lateral de ratones con azul trypan, y la cantidad necesaria para lograr la misma cantidad de difusión que, por ejemplo, 100 unidades de patrón de referencia de hialuronidasa. La cantidad de enzima degradante de hialuronano necesaria es, por lo tanto, funcionalmente equivalente a 100 unidades de hialuronidasa.

La estabilidad de las enzimas degradantes de hialuronano en una composición, tales como las coformulaciones proporcionadas en el presente documento, también puede evaluarse usando otros métodos y ensayos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la estabilidad puede evaluarse determinando la actividad de hialuronidasa, tal como se describe anteriormente y en el ejemplo 2, inspección visual, tal como se describe anteriormente, porcentaje de recuperación y pureza de proteína, con el tiempo, medida mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) (véase, por ejemplo, el ejemplo 3), y la temperatura aparente de fusión. La pureza de la proteína,

determinada mediante RP-HPLC, es el porcentaje de la principal enzima degradante de hialuronano en la coformulación, por ejemplo, rHuPH20, en comparación con todas las especies de hialuronidasa presentes. El porcentaje de recuperación es el porcentaje relativo de la hialuronidasa en la coformulación a lo largo del tiempo y en diversas condiciones de almacenamiento, en comparación con una muestra de referencia. En un ejemplo, se determina la temperatura de fusión de la hialuronidasa en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento midiendo el radio hidrodinámico de las partículas mediante dispersión de luz dinámica (véase, por ejemplo, el ejemplo 7.B). Un aumento en el tamaño de partícula y una disminución en la temperatura de fusión indican la desnaturalización y posterior agregación de la hialuronidasa. La estabilidad de la hialuronidasa en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento puede determinarse midiendo la oxidación de la hialuronidasa, tal como la rHuPH20, mediante RP-HPLC. El porcentaje de oxidación es una medida de la suma de las áreas de picos de los picos principal (ox-1) y secundario (ox-2) (véase, por ejemplo, el ejemplo 10.B). Otros métodos conocidos para un experto en la materia que pueden usarse para determinar la estabilidad de la hialuronidasa en las coformulaciones proporcionadas en el presente documento incluyen electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), inmunotransferencia, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas, dicroísmo circular (CD) y ensayos de fluorescencia basados en colorantes.

J. Usos terapéuticos

Las coformulaciones de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano descritas en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de cualquier afección para la que se emplea una insulina de acción rápida. Las coformulaciones pueden administrarse por vía subcutánea para tratar cualquier afección que sea susceptible de tratamiento con insulina. Esta sección proporciona usos terapéuticos ejemplares de insulina de acción rápida. Los usos terapéuticos descritos a continuación son ejemplares y no limitan las aplicaciones de las coformulaciones descritas en el presente documento. Los usos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2, diabetes gestacional, y para el control glucémico en pacientes críticos. Por ejemplo, las coformulaciones de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano pueden administrarse por vía subcutánea en dosis discretas, tal como a través de una jeringuilla o bolígrafo de insulina, antes de una comida como terapia de insulina prandial en sujetos con diabetes para lograr el control glucémico. Las coformulaciones también pueden administrarse por vía subcutánea o intraperitoneal usando una bomba de insulina o en el contexto de un sistema de bucle cerrado para controlar de manera continua los niveles de glucosa en sangre a lo largo del día y la noche y/o para controlar las alteraciones glucémicas postprandiales. Se encuentra dentro de la capacidad del médico tratante la identificación de dichas enfermedades o afecciones.

Tal como se discute anteriormente, las dosis particulares y los protocolos se individualizan típicamente para cada sujeto. Según necesidad, pueden determinarse o extrapolarse empíricamente una dosis particular y la duración y el protocolo de tratamiento. Por ejemplo, las dosis ejemplares de insulina de acción rápida sin una enzima degradante de hialuronano pueden usarse como punto de partida para determinar las dosis adecuadas de las coformulaciones proporcionadas en el presente documento. Los niveles de dosificación pueden determinarse basándose en una diversidad de factores, tales como el peso corporal del individuo, el estado de salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, la dieta, actividad metabólica, concentraciones de glucosa en sangre, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, de la gravedad y curso de la enfermedad, y la disposición del paciente hacia la enfermedad y el criterio del médico tratante. En particular, las concentraciones de glucosa en sangre, tales como las medidas mediante un sensor de glucosa en sangre, pueden medirse y usarse para determinar la cantidad de insulina y una enzima degradante de hialuronano a administrar para lograr el control glucémico. Se conocen algoritmos en la técnica que pueden usarse para determinar una dosis basada en la velocidad y nivel de absorción de las coformulaciones de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano proporcionadas en el presente documento, y también basándose en los niveles de glucosa. Las dosificaciones de insulina para el control glucémico postprandial también pueden calcularse o ajustarse, por ejemplo, determinando el contenido de carbohidratos de una comida (véase, por ejemplo, Bergenstal et al., (2008) *Diabetes Care* 31:1305-1310, Lowe et al., (2008) *Diabetes Res. Clin. Pract.* 80:439-443, Chiesa et al., (2005) *Acta Biomed.* 76:44-48).

1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (o diabetes) se caracteriza por un metabolismo impedido de la glucosa. La glucosa en sangre procede de los carbohidratos absorbidos en el intestino y producida en el hígado. Los niveles crecientes de glucosa estimulan la liberación de insulina. El flujo de glucosa postprandial puede ser de 20 a 30 veces mayor que la producción hepática de glucosa observada entre comidas. La liberación de insulina de fase temprana, que dura 10 minutos aproximadamente, suprime la producción de glucosa hepática y precede a una fase de liberación más larga (tardía), que dura dos horas o más y abarca el flujo de carbohidratos de la hora de la comida. Entre comidas, un bajo nivel continuo de insulina, insulina basal, cubre las necesidades metabólicas continuas, en particular para regular el gasto de glucosa hepática así como la utilización de la glucosa por el tejido adiposo, el tejido muscular y otros sitios diana. Los pacientes con diabetes presentan elevados niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). La diabetes puede clasificarse en dos grupos principales: diabetes de tipo 1 y diabetes de tipo 2. La diabetes de tipo 1 o diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM), se caracteriza por una pérdida de las células β productoras de insulina de los

islotes de Langerhans en el páncreas, ocasionando una deficiencia de insulina. La causa principal de la deficiencia de células β es autoinmunidad mediada por células T. La diabetes de tipo 2 o diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM), sucede en pacientes con una función impedida de células β . Estos pacientes tienen resistencia a la insulina o sensibilidad reducida a la insulina, combinada con una secreción de insulina reducida. La diabetes de tipo 2 puede en última instancia derivar en diabetes de tipo 1. También se incluye en la diabetes la diabetes gestacional. Puede administrarse a los pacientes con diabetes insulina tanto para mantener los niveles basales de insulina y para prevenir las alteraciones glucémicas, tales como después de una comida.

a. Diabetes de tipo 1

La diabetes de tipo 1 es una enfermedad autoinmunitaria dependiente de células T caracterizada por la infiltración de los islotes de Langerhans, la unidad endocrina del páncreas, y la destrucción de las células β , dando lugar a una deficiencia en la producción de insulina y a hiperglucemia. La diabetes de tipo 1 se diagnostica más comúnmente en niños y adultos jóvenes, pero puede diagnosticarse a cualquier edad. Los pacientes con diabetes de tipo 1 pueden presentar, además de bajos niveles de insulina y altos niveles de glucosa en sangre, poliuria, polidipsia, polifagia, visión borrosa y fatiga. Los pacientes pueden diagnosticarse cuando presentan niveles de glucosa en sangre de o por encima de 126 mg/dl (7,0 mmol/l), niveles de glucosa en sangre de o por encima de 200 mg/dl (11,1 mmol/l) dos horas después de una carga de glucosa oral de 75 g, tal como en una prueba de tolerancia a la glucosa, y/o niveles de glucosa en sangre aleatorios de o por encima de 200 mg/dl (11,1 mmol/l).

El tratamiento principal para pacientes con diabetes de tipo 1 es la administración de insulina como terapia de reemplazo, que típicamente se efectúa conjuntamente con el control de la glucosa en sangre. Sin suficiente reemplazo de insulina, puede desarrollarse cetoacidosis diabética, que puede dar como resultado coma o la muerte. A los pacientes se les puede administrar inyecciones subcutáneas de insulina de acción rápida usando, por ejemplo, una jeringuilla o bolígrafo de insulina, o una bomba de insulina para mantener los niveles adecuados de glucosa en sangre durante el día y también para controlar los niveles de glucosa postprandiales. En algunos casos, una bomba de insulina, incluyendo en el contexto de un sistema de bucle cerrado, puede usarse para administrar insulina por vía intraperitoneal. Por lo tanto, puede administrarse a los pacientes con diabetes de tipo 1 las coformulaciones de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano descritas en el presente documento por vía subcutánea o intraperitoneal a través de una jeringuilla, bolígrafo de insulina, o una bomba de insulina, o cualquier otro medio útil para administrar insulina, para controlar más rápidamente los niveles de glucosa e insulina en sangre.

b. Diabetes de tipo 2

La diabetes de tipo 2 se asocia con resistencia a la insulina y, en algunas poblaciones, también con insulinoopenia (pérdida de función de células β). En la diabetes de tipo 2, la liberación de insulina de fase 1 está ausente, y la liberación de fase 2 está retrasada y es inadecuada. El fuerte pico de liberación de insulina que sucede en los sujetos sanos durante y después de una comida se ve retrasado, prolongado, y su cantidad es insuficiente en pacientes con diabetes de tipo 2, dando como resultado hiperglucemia. Puede administrarse a los pacientes con diabetes de tipo 2 insulina para controlar los niveles de glucosa en sangre (Mayfield et al. (2004) Am Fam Physican 70:489-500). Esto puede efectuarse con otros tratamientos y regímenes de tratamiento, incluyendo dieta, ejercicio y otras terapias antidiabéticas (por ejemplo, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, tiazolidindionas e inhibidores de alfa-glucosidasa). Por lo tanto, puede administrarse a los pacientes con diabetes de tipo 2 las coformulaciones de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano descritas en el presente documento por vía subcutánea o intraperitoneal a través de una jeringuilla, bolígrafo de insulina, o una bomba de insulina, o cualquier otro medio útil para administrar insulina, para controlar más rápidamente los niveles de glucosa e insulina en sangre.

c. Diabetes gestacional

Las mujeres gestantes que nunca han tenido diabetes anteriormente pero que tienen altos niveles de glucosa en sangre durante el embarazo son diagnosticadas de diabetes gestacional. Este tipo de diabetes afecta a aproximadamente un 1-14 % de todas las mujeres embarazadas, dependiendo de la población estudiada (Carr et al., (1998) Clinical Diabetes 16). Aunque la causa subyacente sigue siendo desconocida, parece probable que las hormonas producidas durante el embarazo reducen la sensibilidad de la mujer embarazada a la insulina. El mecanismo de resistencia a la insulina es probablemente un defecto post-receptor, ya que se ha demostrado la unión normal de insulina a células sensibles a la insulina. El páncreas libera 1,5-2,5 veces más insulina para responder al aumento resultante en la resistencia a la insulina. Los pacientes con función pancreática normal son capaces de satisfacer estas demandas. Los pacientes con función pancreática límite tienen dificultades para aumentar la secreción de insulina y por consiguiente producen niveles inadecuados de insulina. La diabetes gestacional, por lo tanto, aparece cuando hay una secreción de insulina retardada o insuficiente en presencia de aumento de resistencia periférica a la insulina.

Puede administrarse insulina a las pacientes con diabetes gestacional para controlar el nivel de glucosa en sangre. Por lo tanto, puede administrarse a las pacientes con gestacional las coformulaciones de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano descritas en el presente documento por vía subcutánea a través de una

jeringuilla, bolígrafo de insulina, bomba de insulina o páncreas artificial, o cualquier otro medio, para controlar más rápidamente los niveles de glucosa e insulina en sangre.

2. Terapia de insulina para pacientes críticos

5 La hipoglucemia y la resistencia a la insulina suceden frecuentemente en pacientes médica o quirúrgicamente críticos y se ha asociado con una morbilidad y mortalidad aumentadas en pacientes tanto diabéticos como no diabéticos y en pacientes con lesión traumática, ictus, lesión cerebral anóxica, infarto agudo de miocardio, después de cirugía cardíaca, y otras causas de enfermedad crítica (McCowen et al. (2001) Crit. Clin. Care 17:107-124). Se ha tratado a los pacientes críticos con hiperglucemia con insulina para controlar los niveles de glucosa en sangre. Dicho tratamiento puede reducir la morbilidad y la mortalidad entre este grupo (Van den Berghe et al. (2006) N. Eng. J Med. 354:449-461). La insulina se administra típicamente por vía intravenosa al paciente, tal como mediante inyección con una jeringuilla por un practicante médico o mediante infusión usando una bomba de insulina. En algunos ejemplos, se usan algoritmos y programas informáticos para calcular la dosis. Por lo tanto, puede administrarse a los pacientes críticos con hiperglucemia una coformulación de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano descrita en el presente documento para controlar los niveles de glucosa, aliviando de este modo la hiperglucemia y reduciendo la morbilidad y mortalidad.

K. Terapias de combinación

20 Puede administrarse cualquiera de las formulaciones de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano descritas en el presente documento en combinación con, antes de, de manera intermitente con, o después de, otros agentes o procedimientos terapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, otros compuestos biológicos y de molécula pequeña. Para cualquier enfermedad o afección, incluyendo aquellas ejemplificadas anteriormente, para las que está indicada o se ha usado una insulina de acción rápida y para la que hay disponibles otros agentes y tratamientos, pueden usarse las coformulaciones en combinación con las mismas. Dependiendo de la afección o trastorno que se vaya a tratar, las combinaciones ejemplares incluyen, pero sin limitación, una combinación con fármacos antidiabéticos, incluyendo, pero sin limitación, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, tiazolidindionas, inhibidores de alfa-glucosidasa, análogos peptídicos, incluyendo análogos del péptido similar a glucagón (GLP) y análogos del péptido inhibidor gástrico (GIP) e inhibidores de DPP-4. En otro ejemplo, pueden administrarse las coformulaciones de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano descritas en el presente documento en combinación con, antes de, de manera intermitente con, o después de, otras una o más insulinas, incluyendo insulina de acción rápida, e insulinas de acción basal.

L. Artículos de fabricación y kits

35 Las coformulaciones de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano proporcionadas en el presente documento pueden envasarse como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para controlar los niveles de glucosa en sangre, tal como en sujetos diabéticos o críticos, y una etiqueta que indica que las coformulaciones son para su uso para controlar los niveles de glucosa en sangre.

45 Los artículos de fabricación proporcionados en el presente documento contienen materiales de envasado. Los materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos se conocen bien por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.252. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéutico incluyen, pero sin limitación, paquetes blíster, frascos, tubo, inhaladores, bombas, bolsas, viales, envases, jeringas, frascos, y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y para un modo de administración y tratamiento previsto.

50 Las coformulaciones de una insulina de acción rápida y una enzima degradante de hialuronano también pueden proporcionarse en forma de kits. Los kits pueden incluir una coformulación descrita en el presente documento y un artículo para su administración. Los kits también incluyen composiciones farmacéuticas adicionales. En un ejemplo, los kits pueden incluir una o más de las coformulaciones proporcionadas en el presente documento y otras una o más composiciones de insulina, tales como, por ejemplo, insulinas de acción lenta o de acción intermedia, incluyendo insulinas cristalinas, o cualquier combinación de los mismos. Las coformulaciones de una insulina de acción rápida y enzima degradante de hialuronano pueden suministrarse con un dispositivo para su administración, tal como una jeringa, un bolígrafo de insulina, una bomba, o un depósito que se inserta en un bolígrafo de insulina, una bomba u otro dispositivo de administración. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para la aplicación, incluyendo dosificaciones, pautas de dosificación e instrucciones para los modos de administración. Los kits también pueden incluir una coformulación descrita en el presente documento y un artículo para diagnósticos. Por ejemplo, dichos kits pueden incluir un monitor o sensor de glucosa.

M. EJEMPLOS

65 Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1**Preparación de solución madre de insulina y análogo de insulina****5 A. Insulina regular**

Para la insulina regular, el polvo (Insulina Organon API, insulina humana recombinante SIHR 143) se pesó y mezcló con una cantidad adecuada de agua hasta que la solución contenía aproximadamente 10-25 mg/ml de insulina. Se añadió HCl 1 M a la mezcla turbia a una concentración final de 20 mM de HCl. La solución se mezcló suavemente con una barra de agitación hasta que se disolvió completamente la insulina y se añadieron 250 mM de Tris, pH 10,7 (Trizma, n.º de cat. T6066, Sigma) a una concentración final de Tris de 20 mM. El pH se ajustó usando NaOH 1 M y después se añadió agua, de tal forma que la insulina se formuló tal como se describe en cada uno de los ejemplos individuales más adelante. La insulina contiene aproximadamente 13 µg/ml de cinc.

15 B. Análogos de insulina

Para los análogos de insulina (ya sea insulina Aspart o insulina Lispro), 12 viales (de 10 ml cada uno) de producto comercial (Insulina Lispro: Humalog® de Eli Lilly (insulina Lispro) 100 U/ml, Lote A572364; Insulin Aspart: Novo Nordisk, NovoRapid® (insulina Aspart), Lote XS60195; Insulina Glulisina: insulina Apidra®) se agruparon y concentraron usando un concentrador de columna Amicon Ultracel-10 K (Insulina Lispro) o 3K (Insulina Aspart) hasta que la concentración final era aproximadamente 5 veces la concentración original. Los análogos de insulina se precipitaron mediante adición de acetato de sodio 1 M, pH 5,3 y cloruro de cinc 30 mM (ZnCl₂, EMD, n.º de cat. ZX0065-1) a 1/10 del volumen de la solución de proteína. Las soluciones se colocaron sobre hielo durante 30 minutos seguido de centrifugación a 5600 rpm durante 20 minutos en una centrifugadora Avanti J-E con un rotor de cubeta oscilante JS-5.3 (Beckman Coulter). Se decantó el sobrenadante y se resuspendió y lavó el sedimento con acetato de sodio 20 mM, cloruro de cinc 2 mM, solución a pH 5,5. La solución resuspendida se centrifugó tal como se describió anteriormente. La etapa de lavado se repitió un total de 5 veces. Se efectuó un lavado final con acetato de sodio 20 mM, pH 5,5 para eliminar todas las trazas de cloruro de cinc. La pasta de proteína resultante se disolvió con agua que contenía HCl 20 mM. Después de su completa disolución, se añadió Tris 250 mM, pH 10,7 a una concentración final de Tris de 20 mM. El pH de la solución resultante se ajustó de tal forma que el análogo de insulina se formuló tal como se describe en cada uno de los ejemplos individuales más adelante y se ajustó la concentración de proteína a aproximadamente 15-20 mg/ml. Un análogo de insulina preparado de este modo tenía un rendimiento típico de aproximadamente el 90 %, con una concentración residual de conservante de menos de 100 veces la del material de partida.

Ejemplo 2**Determinación de la actividad de hialuronidasa de rHuPH20**

La actividad de hialuronidasa de rHuPH20 (obtenida mediante expresión y secreción en células CHO de un ácido nucleico que codifica los aminoácidos 36-482 de la SEQ ID NO: 1) se determinó usando un ensayo turbidimétrico. En los primeros dos ensayos (A y B), se midió la actividad de hialuronidasa de rHuPH20 incubando rHuPH20 soluble con hialuronato sódico (ácido hialurónico) y después precipitando el hialuronato sódico no digerido mediante adición de albúmina de suero acidificada. En el tercer ensayo (C), se midió la actividad de hialuronidasa de rHuPH20 basándose en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico (HA) se une con cloruro de cetilpiridinio (CPC). En todos los ensayos que contenían 600 U/ml de rHuPH20 (5 µg/ml), el criterio de aceptación fue actividad enzimática por encima de 375 U/ml.

A. Ensayo de microturbidez

En este ensayo, se midió la actividad de hialuronidasa de rHuPH20 incubando rHuPH20 soluble con hialuronato sódico (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo determinado (10 minutos) y después precipitando el hialuronato sódico no digerido con la adición de albúmina de suero acidificada. La turbidez de la muestra resultante se midió a 640 nm después de un periodo de revelado de 30 minutos. La reducción en la turbidez resultante de la actividad enzimática en el sustrato de hialuronato sódico fue una medida de la actividad de hialuronidasa de rHuPH20. El método se llevó a cabo usando una curva de calibración generada con diluciones de un patrón de referencia de un ensayo de trabajo de rHuPH20 soluble, y las mediciones de actividad de la muestra se efectuaron en relación a esta curva de calibración. Se prepararon diluciones de la muestra en soluciones de diluyente enzimático. La solución de diluyente enzimático se preparó disolviendo 33,0 ± 0,05 mg de gelatina hidrolizada en 25,0 ml de tampón de reacción PIPES 50 mM (140 mM de NaCl, PIPES 50 mM, pH 5,5) y 25,0 ml de agua estéril para inyección (SWFI; Braun, número de producto R5000-1) y diluyendo 0,2 ml de una solución de albúmina de suero humana al 25 % (US Biologicals) en la mezcla y agitando vorticialmente durante 30 segundos. Esto se efectuó dentro de las 2 horas de uso y se almacenó sobre hielo hasta que se necesitó. Las muestras se diluyeron a una estimación de 1-2 U/ml. En general, la dilución máxima por etapa no sobrepasó 1:100 y el tamaño de la muestra inicial para la primera dilución no fue menor de 20 µl. Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para llevar a cabo el ensayo fueron: Muestras en proceso, fracciones de FPLC: 80 µl; Sobrenadantes de cultivo tisular: 1 ml;

Material concentrado 80 µl; Material purificado o de etapa final: 80 µl. Las diluciones se efectuaron por triplicado en una placa de 96 pocillos de baja unión a proteína, y se transfirieron 30 µl de cada dilución a placas de fondo negro/transparente Optilux (BD BioSciences).

- 5 Las diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2,5 U/ml se prepararon 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 de reactivo" que contenían 60 µl de solución de diluyente enzimático se incluyeron en la placa como control negativo. La placa se cubrió entonces y se calentó en un bloque calentador durante 5 minutos a 37 °C. Se retiró la tapa y se agitó la placa durante 10 segundos. Después de la agitación, se devolvió la placa al bloque de calor y se cebó el dispositivo de manejo de líquidos MULTIDROP 384 con la solución caliente de hialuronato sódico 0,25 mg/ml (preparada disolviendo 100 mg de hialuronato sódico (LifeCore Biomedical) en 20,0 ml de SWFI. Esto se mezcló rotando y/o meciedo suavemente a 2-8 °C durante 2-4 horas, o hasta la completa disolución). La placa de reacción se transfirió al MULTIDROP 384 y se inició la reacción pulsando la tecla de inicio para dispensar 30 µl de hialuronato sódico en cada pocillo. Entonces se retiró la placa del MULTIDROP 384 y se agitó durante 10 segundos antes de transferirse al bloque de calentamiento reemplazando la tapa de la placa. La placa se incubó a 37 °C durante 10 minutos.

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

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

30 B. Ensayo de turbidez para actividad enzimática de rHuPH20

Las muestras se diluyeron con diluyente enzimático [66 mg de hidrolizado de gelatina (Sigma, n.º G0262) disuelto en 50 ml de tampón fosfato (fosfato 25 mM, pH 6,3, NaCl 140 mM) y 50 ml de agua desionizada (DI)] para lograr una concentración enzimática esperada de entre 0,3 y 1,5 U/ml.

- 35 Cada uno de los dos tubos de ensayo marcados como Patrón 1, 2, 3, 4, 5, o 6, y los tubos de ensayo duplicados para cada muestra que se iba a analizar (marcados correspondientemente) se colocaron en un bloque calentador a 37 °C. Se añadieron los volúmenes de diluyente enzimático mostrados en la siguiente tabla en duplicado a los tubos de ensayo de patrón. Se dispensaron 0,50 ml de solución de sustrato de HA [1,0 ml de ácido hialurónico a 5 mg/ml (ICN, n.º 362421) en agua DI, 9 ml de agua DI, 10 ml de tampón fosfato] en todos los tubos de ensayo de patrón y de muestra. Se dispensaron volúmenes de 1,5 U/ml de patrón de hialuronidasa USP (USP, n.º 31200) en diluyente enzimático en tubos de ensayo duplicados de patrón tal como se indica en la tabla 7 a continuación. Cuando se hubieron completado todos los tubos de ensayo de patrón, se dispensaron 0,50 ml de cada muestra en cada uno de los tubos de ensayo de muestra duplicados. Después de una incubación de 30 minutos a 37 °C, se añadieron 4,0 ml de solución de trabajo de suero {50 ml de solución madre de suero [1 volumen de suero de caballo (manada donante, ensayado para cultivo celular, ensayado para cultivo de hibridoma, origen de EE.UU.), 9 volúmenes de tampón acetato 500 mM, ajustado a pH 3,1, dejado reposar a temperatura ambiente 18-24 horas, almacenado a 4 °C] más 150 ml de tampón acetato 500 mM} a los tubos de ensayo de patrón, que entonces se retiraron del bloque calentador, se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente. Los tubos de ensayo de muestra se procesaron de este modo hasta que se hubieron procesado todos los tubos de ensayo de patrón y de muestra.

- 55 Se preparó una solución de "blanco" combinando 0,5 ml de diluyente enzimático, 0,25 ml de agua DI, 0,25 ml de tampón fosfato y 4,0 ml de solución de trabajo de suero. Se mezcló la solución y se transfirió una alícuota a una cubeta desechable. Esta muestra se usó para ajustar el cero del espectrofotómetro a 640 nm.

Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se transfirió una alícuota de cada tubo de ensayo de patrón en su lugar a una cubeta desechable y se midió la absorbancia a 640 nm. Este procedimiento se repitió para los tubos de ensayo de muestra duplicados.

- 60 Se construyó una curva de calibración lineal representando la concentración de hialuronidasa (U/ml) frente a la absorbancia observada. Se usó análisis de regresión lineal para ajustar los datos (excluyendo los datos para el patrón de calibración de 0,0 U/ml) y para determinar la pendiente, el punto de corte y el coeficiente de correlación (r^2). Se usaron una ecuación de regresión de curva patrón y la absorbancia de la muestra observada para determinar las concentraciones de la muestra.

65

Patrón	U/ml	ml de diluyente enzimático	ml de hialuronidasa USP 1,5 U/ml
1	0,0	0,50	0
2	0,3	0,40	0,10
3	0,6	0,30	0,20
4	0,9	0,20	0,30
5	1,2	0,10	0,40
6	1,5	0	0,50

C. Ensayo de turbidez para actividad enzimática de rHuPH20

El método turbidimétrico para la determinación de la actividad de hialuronidasa y la concentración de enzima se basó en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico (HA) se une con cloruro de cetilpiridinio (CPC). La actividad se midió incubando hialuronidasa con hialuronano durante un periodo de tiempo determinado (30 minutos) y después precipitando el hialuronano no digerido mediante la adición de CPC. La turbidez de la muestra resultante se mide a 640 nm y la disminución en la turbidez resultante de la actividad enzimática en el sustrato de HA fue una medida de la potencia de la hialuronidasa. El método se lleva a cabo usando una curva de calibración generada con diluciones patrón de referencia de trabajo de ensayo de rHuPH20, y las mediciones de actividad de la muestra se efectuaron en relación a la curva de calibración. El método estaba previsto para el análisis de la actividad de rHuPH20 en soluciones después de dilución a una concentración de ~2 U/ml. El intervalo cuantitativo fue de 0,3 a 3 U/ml, aunque para pruebas rutinarias se obtuvo un rendimiento óptimo en el intervalo de 1 a 3 U/ml.

El diluyente enzimático se preparó reciente disolviendo 100 mg \pm 10 mg de hidrolizado de gelatina (Sigma n.º G0262) en 75 ml de la solución de tampón de reacción (140 mM de NaCl, PIPES 50 mM (1,4 piperazin bis (ácido 2-etanosulfónico)), pH 5,3) ácido libre (Mallinckrodt, n.º V249) y 74,4 ml de agua estéril para irrigación (SWFI) y añadiendo 0,6 ml de albúmina de suero humana (HSA) al 25 %. Se preparó un blanco de espectrofotómetro añadiendo 1,0 ml de diluyente enzimático a un tubo de ensayo y colocándolo en un bloque de calentamiento precalentado a 37 °C. Se preparó un patrón de referencia diluido preparando una dilución 1:25 del patrón de referencia de trabajo de ensayo de rHuPH20 en triplicado añadiendo 120 ml del patrón de referencia de trabajo de ensayo a 29,880 ml de diluyente enzimático. Se prepararon diluciones adecuadas de cada muestra en triplicado para dar una solución de ~2 U/ml.

Los volúmenes de diluyente enzimático se dispensaron en triplicado en tubos de ensayo de patrón de acuerdo con la tabla 8. Se dispensaron 500 μ l de una solución de hialuronato sódico 1,0 mg/ml (Lifecore, n.º 81, con un peso molecular medio de 20-50 kDa) en SWFI en todos los tubos de ensayo excepto en el de blanco, y se colocaron los tubos en el bloque de calentamiento a 37 °C durante 5 minutos. Se añadió la cantidad del patrón de referencia diluido indicado en la tabla 7 a los tubos de ensayo de patrón adecuados, se mezclaron y se devolvieron al bloque de calentamiento. Se aplicaron 500 μ l de cada muestra a los tubos adecuados en triplicado. 30 minutos después de que se iniciase el primer tubo de patrón, se disolvieron 4,0 ml de solución de parada (5,0 mg/ml de cloruro de cetilpiridinio) (Sigma, n.º de cat. C-5460) en SWFI y se pasaron a través de un filtro de 0,22 micrómetros) a todos los tubos (incluyendo el de blanco), que entonces se mezclaron y colocaron a temperatura ambiente.

El blanco del espectrofotómetro se fijó a una longitud de onda fija de 640 nm. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se transfirieron aproximadamente 1 ml de patrón o de muestra a una cubeta desechable y se leyó la absorbancia a 640 nm. Los valores de datos en bruto del patrón de referencia y de la muestra se analizaron empleando el programa informático GRAPHPAD PRISM® (Hearne Scientific Software) usando una función de caída exponencial restringida a hasta la caída completa. Se determinó la curva patrón de mejor ajuste y se usó para calcular las concentraciones correspondientes de la muestra.

Patrón	U/ml	Diluyente enzimático (ml)	Patrón de referencia diluido (ml)
1	0,0	500	0
2	0,6	400	100
3	1,2	300	200
4	1,8	200	300

Tabla 8. Diluciones de patrones enzimáticos			
Patrón	U/ml	Diluyente enzimático (ml)	Patrón de referencia diluido (ml)
5	2,4	100	400
6	3,0	0	500

Ejemplo 3.**RP-HPLC**

5

En este ejemplo, se usó HPLC en fase reversa (RP-HPLC) para determinar la solubilidad aparente de la insulina y análogos de insulina y el porcentaje de pureza de rHuPH20. La solubilidad aparente se midió como el porcentaje de recuperación de insulina comparado con las formulaciones/condiciones iniciales.

10 Patrones de referencia

Para la insulina regular, se usó Humulin® (insulina regular, 100 U) como patrón. Para la insulina lispro, se reconstituyó un vial de Lispro USP con 1,72 ml de HCl 0,01 N, dando como resultado un patrón de referencia de Lispro USP de 3,5 mg/ml (100 U/ml). Para la insulina Aspart, se reconstituyó un vial de Aspart EP con 1,00 ml de HCl 0,01 N, dando como resultado un patrón de referencia de Aspart EP de 3,89 mg/ml. Para rHuPH20, se usaron tres patrones de referencia, conteniendo cada uno 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml o 7,5 µg/ml de rHuPH20, generados diluyendo una muestra de rHuPH20 a 50 µg/ml (Lote HUB0701EB) con una cantidad adecuada de diluyente de muestra (20 mM de Tris, NaCl 130 mM, Poloxamer 188 al 0,01 %, pH 7.3).

20 Patrones de conservante

Se usaron tres patrones de referencia de conservante, conteniendo cada uno metacresol/fenol al 0,05 %, metacresol/fenol al 0,10 % o metacresol/fenol al 0,15 %.

25 Preparación de muestras

Las muestras se diluyeron, en caso necesario, en diluyente de muestra, de tal forma que la insulina/análogo de insulina estaba presente a 100 U/ml y la rHuPH20 estaba presente a 5 µg/ml. Las muestras se prepararon retirando 100 µl de cada vial en cada instante y centrifugando antes de su carga. Las muestras se almacenaron en un automuestreador a 4 °C antes de su uso, y se consideraron estables durante 3 días después de la preparación. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

Para la insulina, se inyectaron 20 µl para cada ejecución de HPLC. Para rHuPH20, se inyectaron 100 µl para cada ejecución de HPLC. La columna de HPLC y los parámetros del método se exponen en la tabla 9 a continuación. El gradiente de HPLC se expone en la tabla 10 a continuación.

Tabla 9. Columna de HPLC y parámetros del método	
Columna	Phenomenex Jupiter C5 4,6 x 250 mm, 5 µM, 300A o Agilent Zorbax 300SB-C18 4,6 x 250 mm (n.º de cat. 880995-902)
Volumen de inyección	20 µl para el contenido de insulina y 100 µl para el contenido de rHuPH20
Inyecciones de blanco	10 µl de fase móvil B
Temperatura de la columna	40 °C ± 1 °C
Termostato de la muestra	4 °C ± 3 °C
Detección λ	280 nm
Fase móvil A	Ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % en agua
Fase móvil B	TFA al 0,1 % en acetonitrilo
Tiempo de Ejecución	39 minutos
Almacenamiento de la	Acetonitrilo al 100 %

Tabla 9. Columna de HPLC y parámetros del método

columna	
---------	--

Tabla 10. Gradiente de HPLC

Tiempo	Caudal	% A	% B
0	1,0	72	28
3	1,0	72	28
20	1,0	65	35
29	1,0	15	85
29,1	1,0	0	100
34	1,0	0	100
34,1	1,0	72	28
39	1,0	72	28

A. Solubilidad de la insulina

5 Para determinar la solubilidad aparente, se integraron el área del pico de insulina/pico principal de análogo de insulina y el pico desamido y se combinaron para calcular el porcentaje en relación a los patrones. La solubilidad se expresó como porcentaje en relación al patrón, siendo 120 U/ml el 100 %. Los datos se procesaron usando el programa Design-Expert® 7.0 (StatEase) y la característica de "datos históricos". El porcentaje de pureza de insulina se expresó como el porcentaje de insulina principal frente a todas las especies de insulina.

10

B. Porcentaje de pureza y porcentaje de recuperación de rHuPH20

El porcentaje de pureza de rHuPH20 se expresó como el porcentaje de rHuPH20 frente a todas las especies de rHuPH20. El porcentaje de recuperación de rHuPH20 se expresó como porcentaje relativo respecto del patrón, siendo 5 µg/ml el 100 %. La especificación diana es de 3-7 µg/ml (60-140 %).

15

Ejemplo 4**Cromatografía de exclusión por tamaño**

20

En este ejemplo, se analizaron las formulaciones de insulina/rHuPH20 mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) para determinar las cantidades relativas de proteína de alto peso molecular (HMWP), es decir, agregados unidos covalentemente, de insulina y rHuPH20 presentes en la muestra. Para la SEC desnaturalizante, la fase móvil fue L-arginina y ácido acético glacial en acetonitrilo. Para la SEC no desnaturalizante, que se usó tal como se describe en el ejemplo 29, la fase móvil fue suero salino tamponado con fosfato.

25

A. SEC desnaturalizante**1. Patrones de referencia**

30

Como patrones de referencia se usaron Humulin® R (insulina regular, Lilly, concentrada, NDC 0002-8501-01) o insulina humana USP (USP n.º de cat. I1F270) y rHuPH20 (lote HUA0703MA o HUB0701EB con sus actividades específicas a 120.000 U/mg y 110.000 U/mg, respectivamente). Los patrones de referencia, que contenían tanto insulina como rHuPH20, se prepararon a concentraciones similares a las concentraciones de muestra esperadas, es decir, 100 U/ml de insulina y 5 µg/ml de rHuPH20. Las formulaciones líquidas se diluyeron en diluyente Tris 25 mM, pH 7,3. Se diluyeron cantidades ponderadas de insulina humana USP en diluyente Tris al que se le había añadido TFA (2 µl de TFA/ml de Tris). Las muestras de referencia se almacenaron en viales de HPLC a 10 °C antes de su uso.

35

40

2. Preparación de muestras

En caso necesario, las muestras se diluyeron en diluyente Tris, de tal forma que la insulina estaba presente en el intervalo de 1-100 U/ml y rHuPH20 estaba presente en el intervalo de 1-1000 µg/ml. Las muestras se almacenaron en viales de HPLC a 10 °C antes de su uso, durante hasta 3 días.

45

3. Preparación de HPLC

La fase móvil se preparó combinando 650 ml de L-arginina 1,0 mg/ml, 150 ml de ácido acético glacial y 200 ml de acetonitrilo. La columna de HPLC y los parámetros del método se exponen en la tabla 11 a continuación. El pico de

50

rHuPH20 aparece aproximadamente a los 13,8 minutos y el pico de insulina aparece aproximadamente a los 20,2 minutos.

Columna	Insulina Waters HMWP, 300 mm x 7,8 mm (n.º de cat 201549)
Velocidad de flujo	0,6 ml/min
Volumen de inyección	100 µl
Inyecciones de blanco	100 µl de fase móvil, Tris, Tris TFA
Temperatura de la columna	25 °C ± 1 °C
Termostato de la muestra	10 °C ± 3 °C
Detección λ	280 nm
Tiempo de Ejecución	30 minutos
Almacenamiento de la columna	etanol al 20 %

5 B. SEC no desnaturizante

1. Patrones de referencia

10 Como patrones de referencia se usaron Humalog® 100 (insulina Lispro, Eli Lilly n.º de cat. VL-1510), NovoLog® 100 (insulina Aspart, Novo Nordisk n.º de cat. 750111) y rHuPH20 (lote T09RD02 [actividad específica 122.000 U/mg], HUA0703MA [actividad específica 120.000 U/mg] o HUB0701EB [actividad específica 122.000 U/mg]). Los patrones de referencia, que contenían tanto insulina como rHuPH20, se prepararon a concentraciones similares a las concentraciones de muestra esperadas, es decir, 100 U/ml de insulina y 5 µg/ml de rHuPH20. Las muestras de referencia se almacenaron en viales de HPLC a 10 °C antes de su uso.

2. Preparación de muestras

15 En caso necesario, las muestras se diluyeron en disolvente de muestra (Tris 20 mM, NaCl 130 mM, Poloxamer 188 al 0,01 %, pH 7,3) de tal forma que la insulina estaba presente en el intervalo de 1-100 U/ml y rHuPH20 estaba presente en el intervalo de 1-20 µg/ml. Las muestras se almacenaron en viales de HPLC a 10 °C antes de su uso, durante hasta 3 días.

3. Preparación de HPLC

25 Se preparó solución de suero salino tamponado con fosfato (PBS) 0,5 X diluyendo PBS 10 X con agua de grado HPLC. La columna de HPLC y los parámetros del método se exponen en la tabla 12 a continuación. El pico de rHuPH20 aparece aproximadamente a los 13 minutos y el pico de insulina aparece aproximadamente a los 18,6 minutos.

Columna	Insulina Waters HMWP, 300 mm x 7,8 mm (n.º de cat 201549)
Velocidad de flujo	0,5 ml/min
Volumen de inyección	30 µl
Inyecciones de blanco	30 µl de fase móvil, diluyente de muestra, HCl 0,01 N
Temperatura de la columna	25 °C ± 1 °C
Termostato de la muestra	10 °C ± 3 °C
Detección λ	280 nm
Tiempo de Ejecución	60 minutos
Almacenamiento de la columna	etanol al 20 %

C. Porcentaje de pureza de insulina

El porcentaje de pureza de insulina se expresó como porcentaje del pico principal de insulina frente a los picos de insulina totales. La especificación diana es de menos del 2 % de proteína de alto peso molecular, es decir, agregados de insulina.

Ejemplo 5

Métodos de ensayo - Osmolalidad, turbidez y pH

En este ejemplo, se describen los métodos de ensayo para determinar la apariencia, osmolalidad, turbidez y pH de las formulaciones de insulina/análogo de insulina y rHuPH20. Estos métodos de ensayo se usan en los ejemplos posteriores.

A. Apariencia

1. Análisis visual

La apariencia de las formulaciones de insulina/rHuPH20 se determinó mediante análisis visual cualitativo de la solución de insulina/rHuPH20 en un vial de vidrio de tipo I. La evaluación de la coloración y claridad de la solución se determinó mediante comparación con la de agua estéril USP (o equivalente) para irrigación (SWFI). Se determinó que la solución acuosa era transparente si su claridad era igual que la de SWFI. Se determinó que la solución acuosa era incolora si tenía la apariencia del SWFI. Los viales se ensayaron a temperatura ambiente y se tuvo cuidado de no provocar turbulencias innecesarias y/o burbujas de aire en las soluciones mientras que se agitaban y/o invertían. Según necesidad, los viales se limpiaron con toallitas que no dejan residuos o sin pelusas y etanol al 70 % antes del ensayo. El procedimiento fue el siguiente: Se activó una lámpara direccional con una lámpara de 150 W o más. Las muestras se prepararon en una campana. Las muestras que se iban a ensayar se invirtieron suavemente para asegurar la homogeneidad antes de transferir >0,5 ml usando una técnica aséptica a un vial de vidrio de tipo 1 para el ensayo. Se preparó una muestra de SWFI del mismo modo. Los viales de muestra de ensayo y de SWFI preparados se invirtieron suavemente para asegurar la homogeneidad, teniendo cuidado de no introducir cualquier burbuja de aire. Los viales de muestra de ensayo y de SWFI se compararon visualmente respecto del color frente a un fondo blanco brillando la fuente de luz desde un cierto ángulo hacia el fondo de los viales. Se consideró que la solución era incolora si tenía la misma apariencia que el SWFI. Los viales de muestra de ensayo y de SWFI se compararon visualmente respecto de la claridad frente a un fondo negro brillando la fuente de luz desde un cierto ángulo hacia el fondo de los viales. Se consideró que la solución era transparente si su claridad era igual que la del SWFI. Se registraron el color, la claridad y la presencia y alcance de cualquier partícula y/o materia extraña visible. El criterio de aceptación era una solución transparente e incolora.

2. Método de iluminador

En este método, se evaluó el grado de claridad y coloración de líquidos para asegurar (visualmente) la calidad del producto respecto de las especificaciones de apariencia aplicables. La inspección se llevó a cabo en una cámara de inspección diseñada específicamente con luz de alta intensidad, contra un fondo blanco y negro. Un líquido es transparente si su opalescencia no es más pronunciada que la de la suspensión de referencia I. Una solución acuosa es incolora si tiene la apariencia del agua o si no tiene una coloración más intensa que la de la solución de referencia especificada (solución de referencia B9).

Preparación de soluciones de referencia

Las soluciones de referencia de color se prepararon mezclando HCl diluido y patrón de color B EP (Solución Patrón Marrón, Ricca Chemical, n.º 2880) tal como se expone en la tabla 13 a continuación. Las soluciones de referencia B₉, B₈, B₇, B₆ se almacenaron en viales de 2 ml sellados con un tapón y un sellado externo. Las soluciones de referencia se prepararon a diario. Se colocaron 2 ml de SWFI en un vial sellado con un tapón y un sellado externo y se almacenaron durante hasta 1 año.

Las soluciones de referencia de claridad se prepararon del modo siguiente. Se preparó una suspensión opalescente primaria mezclando 25 ml de hexametilentetramina (2,5 g en 25 ml de SWFI) y 25 ml de sulfato de hidrazina (1 g en 100 ml de SWFI) y dejando reposar la solución durante 24 horas. La suspensión se almacenó durante hasta 2 meses en un envase de vidrio. La solución de patrón u opalescente se prepararon diluyendo 45 ml de solución opalescente primaria con 2955 ml de SWFI y mezclando bien. Esta solución fue estable durante 3 meses. Las suspensiones de referencia I y II se prepararon mezclando patrón u opalescente y SWFI tal como se expone en la tabla 13 a continuación. Las suspensiones de referencia se almacenaron en viales de 2 ml sellados con un tapón y sellado externo y se prepararon a diario.

Tabla 13. Soluciones de referencia		
Color	HCl 3,3 M (μl)	Patrón de color EP B (μl)
Referencia B ₉	2970	30
Referencia B ₈	2955	45
Referencia B ₇	2925	75
Referencia B ₆	2850	150
Claridad	SWFI (μl)	Patrón de opalescencia (μl)
Suspensión de referencia I	2850	150
Suspensión de referencia II	2700	300

Las muestras de producto se prepararon mezclando en primer lugar la solución de producto y después transfiriendo 2 ml a un vial mientras se trabaja en una campana de clase 100. Los viales se sellaron con un tapón y sellado externo. Se preparó una campana de inspección visual y se comprobó la intensidad de la fuente de luz para asegurar un Lux mayor de 1750. Las muestras de producto se compararon con soluciones y suspensiones de referencia mediante inspección visual. El color se comparó con SWFI y las soluciones de referencia B₆, B₇, B₈ y B₉ vistas en posición horizontal frente a un fondo blanco. La claridad se comparó con las suspensiones de referencia I y II vistas en posición vertical contra un fondo negro. Se registraron el grado de coloración y claridad y el grado de opalescencia tal como se expone en la tabla 14 a continuación.

Tabla 14. Grado de coloración, claridad y grado de opalescencia	
Grado de coloración	Descripción
Incoloro	La muestra de producto tiene el color de SWFI o no tiene una coloración más intensa que la solución de referencia B ₉
Menos coloración que B _x y más coloración que B _{x+1} ; X = 6, 7 u 8	La muestra de producto tiene menos coloración que B _x pero más coloración que B _(x+1)
Igual coloración que B _x ; X = 6, 7 u 8	La muestra de producto tiene la misma coloración que B _x , con X = 6, 7 u 8
Más coloración que B ₆	La muestra de producto tiene más coloración que la solución de referencia B ₆
claridad y grado de opalescencia	Descripción
Transparente	La opalescencia de la muestra de producto no es más pronunciada que la de la suspensión de referencia I
Menos transparente que la suspensión de referencia I y más transparente que la suspensión de referencia II	La claridad de la muestra de producto se encuentra entre la claridad de las dos suspensiones de referencia (I y II).
Menos transparente que la suspensión de referencia II	La claridad de la muestra de producto es menor que la de la suspensión de referencia II

B. Concentración osmótica

La concentración osmótica (osmolalidad) se determinó mediante la medición de la depresión del punto de congelación. El método de ensayo está previsto para el análisis de una solución acuosa con una concentración osmótica de entre 100 y 500 mOsm/kg de agua. La osmometría de depresión de punto de congelación implica pipetear una muestra de la solución que se va a ensayar en un tubo y colocar el tubo en la cámara de enfriamiento de un osmómetro. La muestra se superenfrió (enfriada por debajo del punto de congelación) y después se siembra (se inicia la cristalización) mediante uno de una serie de métodos (es decir, vibración mecánica, vibración ultrasónica, choque térmico o mediante la adición de partículas de semilla sólidas). La temperatura de la muestra se eleva debido al calor de fusión liberado durante el proceso de congelación hasta el equilibrio; en este punto solo una pequeña parte del agua está congelada, tras lo cual se congela más agua y la temperatura comienza a disminuir de nuevo, dando como resultado una región plana, o fase estable, en la curva de enfriamiento. La temperatura en la fase estable es el punto de congelación de la muestra y puede convertirse a unidades de osmolalidad (concentración

osmótica) observando que 1,0 Osmol deprime el punto de congelación del agua en 1,858 °C, en donde 1,0 Osmol = 1,0 mol de partículas osmóticamente activas = $\Phi(n)(C)$, donde:

Φ = coeficiente osmótico;

5 n = número de partículas resultantes de la disociación de cada molécula en solución; y

C = concentración de cada molécula en mol/kg de agua.

Se llevó a cabo una comprobación de calibración (0-2000 mOsm/kg de agua) antes de cada uso del osmómetro (MicroOsmette, Osmómetro de Punto de Congelación, modelo n.º 5004, Precision Systems Inc.) con patrones de 10 500 mOsm/kg y 200 mOsm/kg. Después del encendido inicial, se dejó un tiempo de calentamiento de 10-15 minutos para equilibrar por completo la temperatura. Las muestras, la sonda y el alambre de siembra se limpiaron con una toallita KimWipe antes de cada uso. Las muestras de ensayo se prepararon pipeteando 50 μ l de la solución de 15 insulina/rHuPH20 en un tubo de muestra limpio y seco. El tubo se colocó en el pocillo refrigerador y se midió la osmolalidad de acuerdo con el procedimiento de operación estándar. Este procedimiento se repitió dos veces más para un total de tres resultados independientes por muestra de insulina/rHuPH20. Se registraron los datos en bruto para cada lectura y se consideró válida una lectura si todas las tres lecturas se encontraban dentro de ± 5 mOsm/kg. Se comunicó el valor medio para cada muestra. La osmolalidad varía basándose en la formulación, y a continuación se listan los criterios de aceptación en cada muestra individual.

20 C. Turbidez

La turbidez se determinó midiendo la absorbancia de una solución de insulina/rHuPH20 a 350 nm. Cuando la luz 25 pasa a través de una solución, se atenúa la intensidad debido a la absorbancia y al efecto de dispersión de la luz de la solución. Para medir el efecto de dispersión de la luz debido a una proteína en solución, se seleccionó la longitud de onda de 350 nm para evitar el efecto de absorbancia de la proteína. La cantidad de luz dispersada se ve afectada 30 significativamente por la concentración y tamaño de las moléculas/partículas. Se resta la DO350 de una solución de blanco que contiene todos los componentes, excepto la proteína para obtener una lectura final. Se transfirieron muestras de 200 μ l de cada formulación de insulina/rHuPH20 a ensayar a tres pocillos adyacentes de una placa de microtitulación de fondo plano UV de 96 pocillos. Se añadieron 200 μ l de cada mezcla de excipiente respectiva (menos la proteína) a tres pocillos adyacentes de la placa de microtitulación para su uso como blanco de muestra. Se usó SWFI (200 μ l) como blanco de la placa. La DO350 de cada muestra se leyó en un lector de placas UV-Vis Spectramax 384plus (Molecular Devices). Se registró cada lectura, se promediaron las lecturas por triplicado y se restó la absorbancia media del respectivo blanco de excipiente, y se registró la turbidez ajustada a blanco resultante.

35 D. pH

El pH se midió tal como se describe en el compendio de la Farmacopea de Estados Unidos <791> (pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c791.html). Los criterios de aceptación variaron con cada formulación y se 40 listan a continuación en cada muestra individual. En general, fue necesario un estrecho control del pH (es decir, $\pm 0,2$) para asegurar la solubilidad de la insulina y la estabilidad de PH20. Sin embargo, en la insulina no conservada, la solubilidad de la insulina no se vio afectada por el pH, por lo que el intervalo del criterio de aceptación es grande (es decir, pH 7,0 a 7,8).

45 Ejemplo 6

Estabilidad de rHuPH20 en formulaciones comerciales de insulina y análogos de insulina

En este ejemplo, se determinó la estabilidad de rHuPH20 en formulaciones de insulina comercial y de análogos de 50 insulina midiendo la actividad enzimática de rHuPH20 tras su almacenamiento a 5 °C y 25 °C. En resumen, se prepararon aproximadamente 1500 U/ml de rHuPH20 en un tampón que contenía Hepes 10 mM y NaCl 130 mM, pH 7,0. Posteriormente, se añadieron 0,4 ml de Humulin® comercial (cada ml contiene 100 U de insulina, 2,5 mg/ml de metacresol y 16 ml de glicerina (Eli Lilly)) o Humalog® (cada ml contiene 100 U de insulina, 3,15 mg/ml de metacresol, 16 mg de glicerina, 1,88 mg de Na₂HPO₄, 0,0197 mg de ión de cinc (óxido de cinc), y cantidades traza de fenol (Eli Lilly)) a 3,6 ml de solución de rHuPH20 para formar una mezcla de insulina-rHuPH20 o de análogo de 55 insulina rHuPH20 (dilución 10x para los productos de insulina, concentración final de rHuPH20 de 1350 U/ml). Estas soluciones se almacenaron a 5 °C y 25 °C durante hasta 1 semana. La actividad enzimática de rHuPH20 se midió en los días 0, 1, 2, 3, y 7, tal como se describe en el ejemplo 2B anterior. Los resultados se exponen en la tabla 15 a continuación. Tal como se muestra en la tabla 15, se perdió un 50 % de la actividad de rHuPH20 para la combinación de Humalog®-rHuPH20 (insulina Lispro-rHuPH20) cuando se incubó durante 2 días o más a 25 °C. No se observó una pérdida significativa para Humulin®-rHuPH20 almacenada a 25 °C, presumiblemente debido a la 60 reducción del nivel de conservante en ese producto específico y al factor de dilución.

Tabla 15. Actividad enzimática de rHuPH20 en presencia de Humulin® o Humalog®

Muestra	Actividad enzimática de rHuPH20 (U/ml)				
	0 días	1 día	2 días	3 días	7 días
Humulin®-PH20, 5 °C	1339	1383	1329	1430	1332
Humulin®-PH20, 25 °C	1318	1401	1325	1387	1308
Humalog®-PH20, 5 °C	1264	1202	1172	1239	1140
Humalog®-PH20, 25 °C	1305	966	740	763	248

Ejemplo 7**5 Efectos de los conservantes en rHuPH20**

En este ejemplo, se evaluaron diversos conservantes de insulina y de análogo de insulina comunes respecto de sus efectos en la actividad y estabilidad enzimática de rHuPH20. La actividad enzimática de rHuPH20 se midió tal como se describe en el ejemplo 2 anterior. En los casos donde sea aplicable, se determinó la estabilidad de rHuPH20 mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) tal como se describe en el ejemplo 4 anterior.

A. Actividad enzimática de rHuPH20

En este ejemplo, se evaluaron los conservantes de insulina común y del análogo de insulina, fenol, m-cresol y metilparabeno respecto de sus efectos en la actividad enzimática de rHuPH20 a diversas concentraciones, temperaturas y tiempo. Se añadió cada conservante (para una concentración final indicada en la tabla 16 a continuación), a formulaciones de insulina/rHuPH20 que contenían 3,7 mg/ml de insulina (se usó insulina Organon API [Insulina humana recombinante SIHR 143] en polvo para preparar la solución madre tal como se detalla en el ejemplo 1), y 20 µg/ml de rHuPH20 en 20 mM de Tris/HCl, pH 7,1 y 140 mM de NaCl y se incubaron las muestras a la temperatura indicada durante un periodo de tiempo predeterminado.

Los resultados se muestran en la tabla 16 a continuación, que expone los conservantes y su concentración, el tiempo de incubación y la temperatura, y la actividad enzimática de rHuPH20. Los resultados son dependientes de la temperatura. La actividad enzimática de rHuPH20 se redujo significativamente después de una semana de incubación a 35 °C cuando el nivel general de conservante era relativamente elevado (> 0,2 %). Por el contrario, a temperatura ambiente (25 °C) y menores concentraciones de conservante, rHuPH20 mantiene su actividad relativa durante al menos un mes. En general, a medida que el nivel de conservantes aumenta, se reduce la actividad enzimática de rHuPH20. Además, parece que entre los tres conservantes, m-cresol es el más perjudicial para rHuPH20 seguido de fenol y de metilparabeno.

Tabla 16. Efecto de las especies y concentración de conservante en la actividad de rHuPH20 a temperaturas elevadas

Conservante	Concentración (%)	Actividad enzimática (U/ml)		
		1 mes, 25 °C	1 semana, 35 °C	2 semanas, 35 °C
Fenol	0,05	2103	2128	1996
Fenol	0,1	1980	2094	1997
Fenol	0,2	2128	1995	1822
Fenol	0,4	1910	835	447
m-cresol	0,05	2103	2019	1955
m-cresol	0,1	2188	2147	2069
m-cresol	0,2	2013	466	185
m-cresol	0,4	<LDD	<LDD	<LDD
metilparabeno	0,05	2061	1058 ^z	1018 ^z
metilparabeno	0,1	1919	2085	1968
metilparabeno	0,2	2196	1927	1590
metilparabeno	0,3 ¹	2049	730	447
Sin conservante	0,0	2006	1984	1994

LOD, nivel de detección; El metilparabeno no es soluble al 0,4 %; Estos números fueron inesperadamente bajos y se trataron como "valores anómalos".

B. Temperatura de fusión aparente (Tm) de rHuPH20

En este ejemplo, se determinó la temperatura de fusión (Tm) de rHuPH20 en presencia y ausencia de m-cresol, propil parabeno o fenoxietanol midiendo el radio hidrodinámico de las partículas usando dispersión de luz dinámica. El aumento del tamaño de partícula se debe probablemente a la desnaturalización y posterior agregación de rHuPH20. A medida que aumenta la temperatura, las proteínas se desplegarán, lo que dará lugar a la formación de agregados.

En resumen, se diluyó rHuPH20 (Lote HuB, solución madre a 10 mg/ml) a 1 mg/ml en 25 mM de Tris-HCl, pH 7,5. Se añadieron los conservantes indicados en las muestras de PH20 a partir de una solución madre al 100 %. El tamaño medio de partícula Z se midió mediante dispersión de luz dinámica usando un medidor Nano-ZS de Malven Zeta como función del aumento de la temperatura. Se efectuaron un total de 3 mediciones a cada temperatura en una cubeta de cuarzo de bajo volumen (Helma, 3,00 mm). La temperatura comenzó a 20 °C, con una escala de 2 °C, hasta una temperatura final de 66 °C, con un periodo de equilibrado de 5 minutos a cada temperatura. La intensidad de dispersión de la luz se midió con un detector de retrodispersión de 173° equipado con el instrumento y se calcularon los datos de Z medio de partícula acumulativos con el programa informático DTS (programa informático de tecnología de dispersión) usando un índice refractivo de 1,45 para las muestras de proteína, y usando un índice refractivo de 1,33 para el agua como dispersante. El punto de inflexión en el eje de temperatura en el que hay un aumento significativo en el tamaño de partícula se considera la Tm (temperatura de fusión) aparente en donde la proteína se desnaturaliza y comienza a agregarse.

Los resultados se muestran en la tabla 17 a continuación, que expone el tamaño medio de partícula a diversas temperaturas para 5 formulaciones de PH20 diferentes, tal como se muestra en la tabla 17 a continuación. Los datos en la tabla 17 es una media de 3 mediciones por punto, a incrementos de temperatura de 2 °C, con un punto de equilibrado de 5 minutos. Los resultados demuestran que la Tm de rHuPH20 se redujo desde más de 40 °C sin ningún conservante hasta 26 °C en presencia de m-cresol al 0,25 %. Se observó una tendencia similar usando calorimetría de barrido diferencial (DSC) para medir la Tm de rHuPH20 con y sin m-cresol, aunque sin embargo la Tm se redujo solo aproximadamente 2 °C en presencia de m-cresol al 0,25 %.

Tabla 17. Tamaño medio de partícula de rHuPH20, con y sin diversos conservantes, medido mediante dispersión de luz dinámica

Temp. (°C)	rHuPH20	rHuPH20+ m-cresol al 0,25 %	rHuPH20+ propilparabeno al 0,2 %	rHuPH20 + fenoxietanol al 1,0 %	rHuPH20 + fenoxietanol al 0,5 %
20	9,48	8,86	9,66	10,51	8,95
22	9,19	11,30	11,40	10,89	9,48
24	9,89	12,49	13,58	10,72	9,95
26	9,96	23,29	28,10	11,54	9,41
28	9,27	113,50	124,57	12,63	9,57
30	8,94	150,93	188,03	13,28	9,40
32	8,96	159,37	237,27	12,97	9,52
34	9,42	158,57	242,13	12,56	9,68
36	9,28	163,27	260,77	14,47	10,13
38	8,91	---	266,43	29,75	11,03
40	9,39	---	277,43	40,18	12,71
42	9,72	---	---	52,28	24,31
44	11,36	---	---	93,99	28,43
46	13,08	---	---	159,13	35,87
48	21,35	---	---	238,33	45,08
50	22,74	---	---	314,00	63,67
52	28,50	---	---	653,13	94,19
54	32,95	---	---	834,30	139,47
56	37,01	---	---	1060,73	---
Tm estimada	44 °C	26 °C	26 °C	38 °C	42 °C

C. Afinidad de unión para rHuPH20

Se usó espectroscopía de fluorescencia de titulación para medir la afinidad de unión aparente de los conservantes a rHuPH20 para entender adicionalmente cómo interactúan los conservantes con rHuPH20. Este estudio se llevó a cabo en Legacy BioDesign, LLC (Johnstown, CO).

5 Los análogos de insulina Lispro (patrón de referencia USP, n.º de cat. 1342321) y Aspart (patrón de referencia EU, n.º de cat. Y0000349) fueron recibidos en forma de polvo y se reconstituyeron con 857 µl de agua desionizada de 18 MΩ y 23 µl de HCl 1 M. Se añadieron 120 µl de Tris 250 mM (pH 10,65) a cada solución de patrón llevando el pH a 7,4 y enrasando el volumen a 1 ml. Se prepararon 2,5 ml de soluciones a 1 mg/ml de cada patrón y de las dos soluciones mediante dilución con Tris 30 mM, pH 7,4. Todas las soluciones eran transparentes e incoloras en el momento de la dilución, a excepción del patrón USP de insulina lispro, que estaba turbio tras su dilución, pero se volvió transparente al cabo de una hora de su preparación. Se prepararon dos muestras de cada uno de insulina Aspart e insulina Lispro, con el patrón de referencia y el material fabricado. Se recogieron los espectros de emisión de fluorescencia de soluciones de insulina a 1 mg/ml usando un espectrofluorómetro Aviv Model ATF 105 y el programa informático Aviv 105, versión 1.3. Se cargó una celda de fluorescencia de cuarzo con 2,5 ml de solución para cada medida. La excitación se efectuó a 275 nm con un ancho de banda de 4 nm. Los espectros de emisión se recogieron entre 340 nm y 280 nm con una resolución de 1 nm. El voltaje PMT se ajustó a 850 V, mientras que el voltaje PMT de referencia (QC) se ajustó a 250 V.

20 Los datos mostraron que aunque había cierta interacción entre los conservantes y rHuPH20, los tres conservantes ensayados (m-cresol, fenol, y alcohol bencílico) no alteraron la estructura de rHuPH20. Las constantes de disociación aparentes (K_D) para las interacciones de rHuPH20 con los conservantes variaron de 40 a 3000 µM, encontrándose la mayoría de los datos en el intervalo de 50 a 100 µM. Los datos también indicaron que aunque rHuPH20 es sensible a los compuestos fenólicos, parece que es una interacción inespecífica y es altamente dependiente de la temperatura ambiental. La conclusión de la interacción inespecífica se vio apoyada además por el hecho de que la adición de un compuesto estructuralmente similar, fenilalanina, no protegió a rHuPH20 frente a la degradación causada por el m-cresol o el fenol (véase la sección E más adelante).

D. Otros conservantes comunes

30 Para determinar si rHuPH20 es sensible a todos los conservantes, o solo a aquellos usados típicamente en los productos de insulina, se ensayaron varios de otros conservantes comerciales respecto de su efecto en la actividad enzimática y estabilidad de rHuPH20. Además, se añadió fenilalanina como estabilizante potencial para evaluar si el efecto perjudicial de los conservantes en rHuPH20 está mediado únicamente por el anillo fenólico presente en varios de los conservantes perjudiciales. Se hipotetizó con que la fenilalanina podría ser capaz de competir con los conservantes fenólicos y proporcionar un efecto estabilizante.

40 En estos estudios, se añadieron un total de 100 µg/ml de rHuPH20 a formulaciones base que contenían 25 mM de Tris/HCl, pH 7,3, NaCl 140 mM, polisorbato 80 al 0,01 % y los conservantes seleccionados al nivel especificado. La concentración seleccionada para cada uno de los conservantes se basó principalmente en datos bibliográficos (véase, por ejemplo, Kibbe, A. H., (2000) Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, Pharmaceutical Press; Powell et al., (1998) PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology) y los niveles conocidos como presentes en los productos comerciales existentes.

45 Los resultados se exponen en las tablas 18-20 a continuación. Estos resultados demuestran que las sales de clorhexidina y timerosal no afectan a la actividad enzimática de rHuPH20. Por el contrario, la adición de cloruro de benzalconio o de 4-cloro-1-butanol provocó una reducción significativa en la actividad enzimática de rHuPH20 tras tan solo 24 horas a 25 °C. La adición de fenoxietanol o m-cresol provocó una reducción en la actividad de rHuPH20 de un modo dependiente de la temperatura. A 4 °C, la actividad de rHuPH20 fue aproximadamente la misma que la muestra de control que no contenía un conservante, mientras que a 35 °C se suprimió la actividad de rHuPH20 en un espacio de tiempo tan breve como de 48 horas (véase la tabla 20). El metilparabeno tuvo generalmente poco efecto en la actividad enzimática de rHuPH20 a 25 °C o durante breves periodos de tiempo, por ejemplo, 24 horas, a 35 °C, pero se perdió toda la actividad enzimática después de incubación a 35 °C durante 6 días. Además, el metilparabeno es un conservante menos eficaz en comparación con m-cresol o fenol. La adición de fenilalanina bien a baja concentración (5 mM) o alta concentración (50 mM) no afectó a la pérdida de actividad de rHuPH20 en presencia de los conservantes fenólicos m-cresol y metilparabeno.

Formulación	t = 0	24 horas, 25 °C	5 días, 25 °C
Cloruro de benzalconio	11.740	10750	2710
4-cloro-1-butanol	11.350	3500	1440
Diclorhidrato de clorhexidina	7.720	8130	8750
Digluconato de clorhexidina	9.590	9520	12310
Timerosal	10.290	8990	8960
L-fenilalanina	13.420	12100	11460

Tabla 18. Actividad de rHuPH20 con diversos conservantes a diferentes temperaturas de almacenamiento

Formulación	t = 0	24 horas, 25 °C	5 días, 25 °C
L-fenilalanina / m-cresol	9.990	8390	13470
L-fenilalanina / metilparabeno	10.780	10620	9390
Sin control de conservante	12.200	12410	10620

Tabla 19. Actividad de rHuPH20 con diversos conservantes a diferentes temperaturas de almacenamiento

Formulación	t = 0	6 días, 35 °C
Cloruro de benzalconio	11.740	<LDC
4-cloro-1-butanol	11.350	<LDC
Diclorhidrato de clorhexidina	7.720	11890
Digluconato de clorhexidina	9.590	12270
Timerosal	10.290	10070
L-fenilalanina	13.420	10660
L-fenilalanina / m-cresol	9.990	<LDC
L-fenilalanina / metilparabeno	10.780	<LDC
Sin control de conservante	12.200	11870

Tabla 20. Actividad de rHuPH20 con diversos conservantes a diferentes temperaturas de almacenamiento

Formulación	48 horas, 4 °C	48 horas, 35 °C
Fenoxietanol	14.700	<LDC
Digluconato de clorhexidina	12.090	13.110
L-fenilalanina	12.540	13.130
L-fenilalanina / m-cresol	12.250	<LDC
L-fenilalanina / metilparabeno	10.480	10.690
m-cresol	10.950	<LDC
metilparabeno	10.380	12.660
Sin control de conservante	12.520	13.200

- 5 La pérdida de actividad enzimática causada por la adición de conservantes y temperaturas elevadas se atribuyó principalmente a la formación de agregados de rHuPH20. Tal como se muestra en las tablas 21-22 a continuación, a 35 °C, una pérdida del pico principal medido mediante cromatografía de exclusión por tamaño fue concomitante a la pérdida de actividad enzimática de rHuPH20 (véanse las tablas 21-22). Además, se observó un pico de agregado significativo para las muestras que contenían m-cresol cuando se almacenaron a 35 °C. Los conservantes comunes provocan una pérdida de actividad de rHuPH20 a temperaturas elevadas y a lo largo del tiempo. Se identificaron los
- 10 conservantes más compatibles, por ejemplo, timerosal y sales de clorhexidina.

Tabla 21. Efecto de los conservantes en la estabilidad de rHuPH20 medida mediante SEC

Conservantes y aditivos	Concentraciones/porcentajes	% del pico principal de rHuPH20 mediante SEC no desnaturalizante	
		4 °C, 1 día	35 °C, 1 día
Cloruro de benzalconio	0,01 %	99,64	<LDD
4-cloro-1-butanol	0,5 %	97,89	<LDD
Diclorhidrato de clorhexidina	0,002 %	98,76	98,12
Digluconato de clorhexidina	0,002 %	98,35	98,23
Timerosal	0,01 %	98,59	98,31
L-fenilalanina	5 mM	98,27	98,86
L-fenilalanina / m-cresol	5 mM / 0,25 %	97,42	31,29
L-fenilalanina / metilparabeno	5 mM / 0,2 %	98,36	39,94
Sin control de conservante	0	98,33	98,85

LDD: Límite de detección

Tabla 22. Efecto de los conservantes en la estabilidad de rHuPH20 medida mediante SEC

Conservantes y aditivos	Concentraciones/porcentajes	% del pico principal de rHuPH20 mediante SEC no desnaturalizante	
		4 °C	35 °C,
Fenoxietanol	1 %	99,81	8,51
Digluconato de clorhexidina	0,002 %	99,77	98,30

Tabla 22. Efecto de los conservantes en la estabilidad de rHuPH20 medida mediante SEC

Conservantes y aditivos	Concentraciones/porcentaje	% del pico principal de rHuPH20 mediante SEC no desnaturalizante	
		4 °C	35 °C,
L-fenilalanina	50 mM	100,00	99,80
L-fenilalanina / m-cresol	50 mM / 0,25 %	95,10	3,287
L-fenilalanina / metilparabeno	50 mM / 0,2 %	96,75	95,07
m-cresol	0,25	100,00	0,834
metilparabeno	0,2	100,00	96,91
Sin control de conservante	0	99,63	99,75

E. Niveles de conservante y eficacia antimicrobiana

5 Actualmente, las diferentes agencias reguladoras tienen diferentes criterios farmacopéicos para la eficacia antimicrobiana para productos farmacéuticos diseñados para multidosis. La tabla 23 muestra los criterios de los fármacos inyectables para cumplir los criterios USP y EP. Por lo tanto, fue necesario determinar las concentraciones de conservante mínimas para cumplir con los diversos criterios para evaluar adicionalmente los efectos de los conservantes en rHuPH20.

Tabla 23. Requisitos USP y EP para prueba de eficacia antimicrobiana

Requisito	Instante	Estados Unidos	Europa	
		USP	EPB (Mínimo)	EPA (Preferido)
Reducción log bacteriana*	6 h			2
	24 h		1	3
	7 d	1,0	3	---
	14 d	3,0	---	---
	28 d	Sin aumento	Sin aumento	Sin recuperación
Reducción log fúngica*	7 d	Sin aumento		2
	14 d	Sin aumento	1	---
	28 d	Sin aumento	Sin aumento	Sin aumento

* Reducción en unidades Log₁₀ respecto del inóculo inicial medido; Sin aumento: aumento de no más de 0,5 unidades log₁₀ que el valor previamente medido.

10 Se prepararon varios lotes de formulaciones que contenían diferentes niveles de conservantes con cantidades diana de insulina y rHuPH20 para las pruebas de eficacia microbiana. Las pruebas se llevaron a cabo por encargo de acuerdo con la orientación de EP y USP por un laboratorio analítico (Quadrants Scientific, Inc., San Diego, CA). Las formulaciones de insulina/rHuPH20 contenían: 100 U/ml de insulina (Insulina Organon API, insulina humana recombinante SIHR 143), 5 µg/ml de rHuPH20, Tris/HCl 20 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM y poloxamer 188 al 0,02 %.

15 La insulina se preparó tal como se describe en el ejemplo 1 anterior. Las diversas formulaciones que contenían conservante se ensayaron respecto de su eficacia antimicrobiana contra *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Las pruebas se llevaron a cabo 1) añadiendo un inóculo inicial (al menos 10⁵ UFC/ml) de cada tipo de bacteria a la muestra y 2) midiendo las UFC/ml de cada tipo de

20 bacteria a las 6 horas, 1 día y 7 días. Los datos en bruto (UFC/ml) se convirtieron a reducción de unidades log 10 a partir del inóculo medido. Las formulaciones se ensayaron a una temperatura de 37 °C y se incubó cada organismo por separado con cada formulación.

25 Los resultados se muestran en la tabla 24, que expone los porcentajes de los conservantes u si la combinación cumplió o no cumplió los criterios de eficacia antimicrobiana para EPA, EPB y USP.

Tabla 24. Pruebas de eficacia antimicrobiana de diferentes niveles y combinaciones de conservante

n.º	m-Cresol (%)	Metilparabeno (%)	Fenol (%)	Criterios de eficacia antimicrobiana		
				EPA	EPB	USP
1	---	---	0,15	No cumple	No cumple	Cumple
2	---	---	0,3	No cumple	No cumple	Cumple
3	0,1	---	---	No cumple	No cumple	No cumple
4	0,15	---	---	No cumple	No cumple	Cumple
5	0,1	0,15	---	No cumple	No cumple	Cumple
6	0,1	0,1	---	No cumple	No cumple	Cumple
7	0,1	0,15	---	No cumple	No cumple	Cumple
8	0,15	0,1	---	No cumple	No cumple	Cumple
9	0,15	0,15	---	No cumple	Cumple	Cumple

Tabla 24. Pruebas de eficacia antimicrobiana de diferentes niveles y combinaciones de conservante

n.º	m-Cresol (%)	Metilparabeno (%)	Fenol (%)	Criterios de eficacia antimicrobiana		
				EPA	EPB	USP
10	0,1	---	0,1	No cumple	No cumple	Cumple
11	0,1	---	0,15	No cumple	Cumple	Cumple
12	0,15	---	0,1	No cumple	Cumple	Cumple
13	0,15	---	0,15	No cumple	Cumple	Cumple
14	0,1	0,15	-	No cumple	No cumple	Cumple
15	---	0,15	0,15	No cumple	No cumple	Cumple
16	---	0,15	0,2	No cumple	No cumple	Cumple
17	---	0,2	0,15	No cumple	No cumple	Cumple
18	---	0,2	0,2	No cumple	No cumple	Cumple
Humalog®	0,315	---	---	Cumple*	Cumple*	Cumple*
Novo Log®	0,172	---	0,15	No cumple*	Cumple*	Cumple*

*Resultado, basado en un valor de 7 días.

Para determinar niveles de conservante adecuados que cumplen con los criterios de eficacia antimicrobiana USP, se llevó a cabo un estudio adicional de combinaciones de alcohol bencílico, fenol y m-cresol. La formulación básica contiene: 3,75 mg/ml de insulina (Insulina Organon API, insulina humana recombinante SIHR 143 y se preparó la solución madre del mismo modo al detallado en el ejemplo 1), 5 µg/ml de rHuPH20, Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM y poloxamer 188 al 0,02 %. Los resultados se muestran en la tabla 25 a continuación, que expone los porcentajes de los conservantes u si la combinación cumplió o no cumplió los criterios de eficacia antimicrobiana para USP. Con la excepción de la formulación n.º 2, todas las combinaciones cumplieron los criterios de eficacia microbiana.

Tabla 25. Pruebas de eficacia antimicrobiana USP de diferentes niveles y combinaciones de conservante

n.º	Alcohol bencílico (%)	Fenol (%)	m-Cresol (%)	Criterios de eficacia antimicrobiana USP*		
				7 días	14 días	28 días
1	0,25	0,1	---	Cumple	Cumple	Cumple
2	0,1	0,15	---	No cumple	Cumple	Cumple
3	0,1	0,1	---	Cumple	Cumple	Cumple
4	0,05	0,2	---	Cumple	Cumple	Cumple
5	0,05	0,15	---	Cumple	Cumple	Cumple
6	0,05	0,1	---	Cumple	Cumple	Cumple
7	0,1	---	0,1	Cumple	Cumple	Cumple
8	0,05	---	0,1	Cumple	Cumple	Cumple
9	0,05	---	0,15	Cumple	Cumple	Cumple
10	0,5	---	---	Cumple	Cumple	Cumple
11	---	0,1	0,08	Cumple	Cumple	Cumple
12	---	0,1	0,06	Cumple	Cumple	Cumple
13	---	0,08	0,08	Cumple	Cumple	Cumple
14	---	0,06	0,1	Cumple	Cumple	Cumple
15	---	0,08	0,1	Cumple	Cumple	Cumple

Se llevaron a cabo experimentos similares con otras combinaciones porcentuales de fenol y m-cresol. Los resultados se ilustran en la tabla 26.

Tabla 26. Niveles mínimos de conservante necesarios para las guías USP y EPB

Criterio		reducción log										Patrón	
		24 horas			7 días			14 días					
		bacterias			bacterias			hongos		hongos			
% de fenol	% de m-cresol	PA	EC	SA	PA	EC	SA	AN	CA	AN	CA	UPS	EPB
0,10	0,15	> 4,5	1,9	0,9	> 4,5	> 48.	> 4,8	2,9	2,0	> 4,2	> 4,4	Cumple	Cumple
0,15	0,10	> 4,1	0,7	0,3	> 4,6	> 4,7	> 4,9	2,0	1,6	> 3,8	> 4,3	Cumple	No cumple
0,175	0,10	> 4,6	1,0	0,3	> 4,6	> 4,7	> 4,8	2,5	1,8	> 4,4	> 4,3	Cumple	No cumple
0,20	0,10	> 4,5	2,0	0,7	> 4,5	> 4,7	> 4,9	3,0	2,5	> 4,4	> 4,2	Cumple	Cumple
0,125	0,125	> 4,6	1,1	0,4	> 4,6	> 4,8	> 4,9	2,5	2,1	> 4,3	> 4,2	Cumple	No cumple
0,15	0,125	> 4,5	2,1	0,7	> 4,5	> 4,8	> 4,8	2,9	2,8	> 4,4	> 4,4	Cumple	Cumple
0,175	0,125	> 4,6	3,6	1,0	> 4,6	> 4,8	> 4,6	3,5	2,6	> 4,3	> 4,4	Cumple	Cumple
0,125	0,15	> 4,5	4,1	1,0	> 4,5	> 4,7	> 4,7	3,8	4,0	> 4,3	> 4,6	Cumple	Cumple

Tabla 26. Niveles mínimos de conservante necesarios para las guías USP y EPB					
Criterio	reducción log			Patrón	
	24 horas	7 días			14 días
	bacterias	bacterias	hongos		hongos
PA: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; EC: <i>Escherichia coli</i> ; SA: <i>Staphylococcus aureus</i> ; AN: <i>Aspergillus niger</i> ; CA: <i>Candida albicans</i> .					

Ejemplo 8

5 Efecto de combinaciones de conservantes y NaCl y pH en la solubilidad de la insulina y la actividad enzimática de rHuPH20

A. Efecto de las combinaciones de conservante en la actividad enzimática de rHuPH20

10 En este ejemplo, se ensayaron combinaciones conservantes de insulina común y de análogos de insulina respecto de sus efectos en la actividad enzimática de rHuPH20 a diversas concentraciones a una temperatura de 30 °C durante 1 mes. Cada conservante se añadió (para los porcentajes finales indicados en la tabla 27 a continuación), a formulaciones de insulina/rHuPH20 que contenían 100 U/ml de insulina, 5 µg/ml (600 U/ml) de rHuPH20, Tris/HCl 20 mM, pH 7,2, 150 mM de NaCl y poloxamer 188 al 0,02 % y se ensayaron las muestras a T = 0 y después de 1 mes de incubación a 30 °C. La insulina se preparó tal como se describe en el ejemplo 1 anterior y se preparó rHuPH20 tal como se describe en el ejemplo 2.

15 Los resultados se exponen en la tabla 27 a continuación, que expone los conservantes y sus porcentajes, y la actividad enzimática de rHuPH20 en el instante T = 0 y después de 1 mes de incubación a 30 °C. Los resultados muestran que la incubación de insulina/rHuPH20 durante 1 mes a 30 °C en presencia de uno o de una conservación de conservantes fenólicos causa una reducción en la actividad enzimática de rHuPH20.

20

Tabla 27. Efecto de combinaciones de conservante fenólico en la actividad de rHuPH20					
n.º	Formulación			Actividad de PH20 (U/ml)	
	m-Cresol (%)	Metilparabeno (%)	Fenol (%)	T = 0	1 mes, 30 °C
1	---	---	0,15	629	564
2	---	---	0,3	579	490
3	0,1	---	---	621	549
4	0,15	---	---	601	538
5	0,1	0,15	---	569	474
6	0,1	0,1	---	351	404
7	0,1	0,15	---	557	481
8	0,15	0,1	---	545	418
9	0,15	0,15	---	530	256
10	0,1	---	0,1	585	526
11	0,1	---	0,15	578	487
12	0,15	---	0,1	550	390
13	0,15	---	0,15	553	262
14	0,1	0,15	---	544	465
15	---	0,15	0,15	546	484
16	---	0,15	0,2	545	392
17	---	0,2	0,15	533	407
18	---	0,2	0,2	513	215

25 En este ejemplo, se ensayaron combinaciones de fenol y m-cresol respecto de sus efectos en la actividad enzimática de rHuPH20 a diversas concentraciones, temperaturas y tiempos de incubación. Cada conservante se añadió (para los porcentajes finales indicados en la tabla 28 a continuación), a formulaciones de insulina/rHuPH20 que contenían 100 U/ml de insulina, 5 µg/ml (600 U/ml) de rHuPH20, Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM, 50 ml de glicerina, metionina 50 mM, y poloxamer 188 al 0,01 %.

30 Los resultados se exponen en la tabla 28 a continuación, que expone los conservantes y sus porcentajes, y la actividad enzimática de rHuPH20 a diversos tiempos y temperaturas de incubación. Tal como se observó anteriormente, la temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo en la actividad enzimática. Independientemente del conservante, las muestras que se incubaron a 30 °C o 37 °C tuvieron una actividad enzimática significativamente reducida en comparación con aquellas incubadas a 25 °C. Además, el m-cresol es más perjudicial para la actividad de rHuPH20 que el fenol. A medida que el porcentaje de m-cresol aumentó, se redujo la actividad enzimática de rHuPH20.

35

Tabla 28. Efecto de las combinaciones de fenol y m-cresol en la actividad de rHuPH20							
Formulación	Fenol %	m-cresol %	actividad de rHuPH20, U/ml				
			25 °C, 1 semana	25 °C, 2 semanas	30 °C, 1 semana	30 °C, 2 semanas	37 °C, 3 días
F1	0,35	---	603	569	178	72	5
F2	0,2	0,1	574	493	114	29	13
F3	0,25	0,1	475	356	23	0,3	8
F4	0,175	0,15	462	342	10	0	26
F5	0,2	0,15	385	297	0	ND	10
F6	0,15	0,175	421	318	3	ND	22
F7	0,2	0,175	265	141	0	ND	15
F8	---	0,25	401	332	3	ND	18

ND, No determinado

B. Efecto del NaCl y el pH en la solubilidad de la insulina Lispro y la actividad enzimática de rHuPH20

- 5 En este ejemplo, se empleó un diseño de estudio factorial completo para determinar los efectos del NaCl y el pH en la solubilidad de insulina Lispro y la actividad enzimática de rHuPH20 en presencia de meta-cresol (m-cresol) al 0,15 % y fenol al 0,15 %. Se evaluaron cuatro valores de pH diferentes y 4 concentraciones de NaCl, generando un total de 16 muestras.
- 10 Todos los componentes, excepto el pH y el NaCl se mantuvieron constantes a 120 U/ml de insulina Lispro, 5 µg/ml de rHuPH20, Tris/HCl 20 mM (Trizma, Sigma, n.º de cat. T6066), m-cresol al 0,15 %, fenol al 0,15 %, poloxamer 188 al 0,01 % (Poloxamer 188, Spectrum, n.º de cat. P1169), y ZnCl₂ 0,1 mM (EMD, n.º de cat. ZX0065-1). Los valores de pH ensayados fueron 7,0, 7,2, 7,4 y 7,6. Las concentraciones de NaCl ensayadas fueron 50, 80, 110 y 140 mM. Los conservantes fueron fenol (Riedel-dh Haen, 16017, compendio múltiple) y m-cresol (Fluka, n.º de cat. 65996). Se
- 15 determinó el porcentaje de recuperación de insulina Lispro para cada muestra, tras su almacenamiento a 2-8 °C durante 0, 0,25, 0,5, 1, 3, 5, 9 y 12 meses. La actividad enzimática de rHuPH20 se midió para cada muestra, tras su almacenamiento a 5 °C durante 2 semanas, 1, 5, 9 y 12 meses, 25 °C durante 1 semana, 2 semanas y 1 mes, 30 °C durante 1 semana y 2 semanas, y 35 °C durante 1 semana.
- 20 Para preparar las 16 muestras, se prepararon 4 soluciones madre, cada una con una concentración de NaCl diferente. La insulina Lispro se preparó tal como se describe en el ejemplo 1 anterior, ajustando el pH final de insulina a 7,6. Todos los demás componentes comunes se añadieron a sus concentraciones finales. El pH de cada solución madre se tituló con NaOH 1 N o 0,1 N de 7,6 hasta 7,0, secuencialmente. La precisión del pH se controló a ± 0,02. Cada vez que se alcanzó el pH designado, se retiró 1 ml de la solución y se cargó en un vial de vidrio de tipo
- 25 1 de 2 ml. Una vez que se prepararon todas las muestras, se almacenaron a 2-8 °C hasta que se llevaron a cabo las pruebas. Se llevó a cabo HPLC de fase reversa (RP-HPLC) tal como se describe en el ejemplo 3 anterior con las siguientes modificaciones. La fase móvil comenzó con ácido trifluoroacético (TFA) del 75 % al 0,1 % en agua (A) y TFA en acetonitrilo del 25 % al 0,1 % (B) con un gradiente lineal a 68 % de A + 32 % de B durante 16 minutos, con una retención durante 4 minutos, seguido de un aumento lineal al 100 % de B durante 5 minutos.
- 30 La tabla 29 a continuación expone la solubilidad, expresada como % restante de la concentración inicial (120 U/ml), tras su almacenamiento a 2-8 °C durante 12 meses. Las tablas 30-31 a continuación exponen la actividad enzimática de rHuPH20 tras diversos tiempos a diferentes temperaturas. La tabla 32 expone el porcentaje de recuperación de rHuPH20 tras varios instantes a diferentes temperaturas. Los resultados de la solubilidad de la
- 35 insulina Lispro y la actividad de rHuPH20 se resumen a continuación.

Solubilidad de insulina Lispro

- 40 Tal como se muestra en la tabla 29 a continuación, la insulina Lispro es estable a bajas concentraciones de sal y alto pH. Por ejemplo, a pH 7,6, la insulina Lispro fue estable durante al menos 12 meses a 50 y 80 mM de NaCl, mientras que fue estable durante solo 2 semanas a 140 mM de NaCl. Por el contrario, a pH 7,0, la insulina Lispro solo fue estable a 50 mM de NaCl durante 5 meses. La solubilidad se redujo por debajo del 65 % tras solo 1 semana a 80, 110 o 140 mM de NaCl.

45 Actividad enzimática de rHuPH20

- 50 Tal como se muestra en las tablas 29-30 a continuación, rHuPH20 es estable a altas concentraciones de sal y bajo pH. rHuPH20 es estable a 5 °C durante 12 meses, aunque con una menor actividad de rHuPH20 a 50 mM de NaCl y después a 140 mM de NaCl. A 25 °C, la actividad enzimática de rHuPH20 se redujo en gran medida a bajas concentraciones de sal tras solo una semana a pH 7,6 y tras 2 semanas a un pH más bajo. A 30 °C, rHuPH20 retuvo una actividad enzimática útil solo a una concentración de 140 mM de NaCl y un pH de 7,0. Tras una semana a 35 °C, no quedaba actividad enzimática de rHuPH20 significativa.

Tabla 29. Solubilidad de insulina Lispro a 2-8 °C

Form. n.º	pH	NaCl	% de recuperación de insulina (meses)							
			0	0,25	0,5	1	3	5	9	12
F16	7,0	50	96,41	95,91	95,12	93,26	81,51	88,84	72,51	58,91
F12	7,0	80	96,36	64,78	40,76	35,90	33,47	32,72	29,34	26,22
F8	7,0	110	96,35	31,18	19,52	18,50	15,05	14,72	14,23	13,63
F4	7,0	140	95,78	21,70	15,04	13,80	11,11	11,14	11,13	10,08
F15	7,2	50	96,68	95,95	95,80	95,42	95,64	96,28	98,59	91,50
F11	7,2	80	96,50	96,06	95,81	86,34	60,90	61,48	50,74	47,02
F7	7,2	110	96,45	66,09	39,64	32,94	58,68	28,02	23,68	21,88
F3	7,2	140	95,82	37,37	25,12	23,62	19,03	17,15	15,99	15,90
F14	7,4	50	96,74	96,44	96,36	95,89	95,90	96,58	98,78	95,82
F10	7,4	80	96,34	96,51	96,49	96,64	96,05	96,25	98,62	95,61
F6	7,4	110	96,69	96,86	93,50	74,63	63,68	68,64	43,83	38,80
F2	7,4	140	95,73	83,13	50,31	39,27	37,45	34,80	27,30	24,01
F13	7,6	50	95,66	96,72	97,02	96,38	96,21	96,71	98,74	96,11
F9	7,6	80	95,48	95,96	96,22	96,34	95,43	96,17	96,91	92,06
F5	7,6	110	95,47	96,74	96,40	96,35	95,89	95,50	84,82	91,38
F1	7,6	140	95,73	95,53	94,46	87,46	64,62	67,99	46,20	41,61

Tabla 30. Efecto de la sal y el pH en la actividad enzimática de rHuPH20 a 35 °C, 30 °C y 25 °C

Form. n.º	NaCl (mM)	pH	t = 0	Actividad enzimática (U/ml)					
				35 °C		30 °C		25 °C	
				1 W	2 W	1 W	2 W	1 W	2 W
F1	140	7,6	588	*	244	133	545	528	461
F2	140	7,4	593	15	322	238	557	494	496
F3	140	7,2	583	31	370	300	585	530	514
F4	140	7,0	576	84	418	387	579	507	513
F5	110	7,6	577	-	163	73	525	496	412
F6	110	7,4	574	-	256	159	541	489	449
F7	110	7,2	581	14	327	257	565	501	505
F8	110	7,0	580	49	376	304	576	512	512
F9	80	7,6	599	9	152	82	498	430	385
F10	80	7,4	574	-	91	17	451	401	290
F11	80	7,2	544	-	230	133	522	444	416
F12	80	7,0	549	-	283	199	518	448	435
F13	50	7,6	526	-	38	-	361	296	178
F14	50	7,4	535	-	47	5	426	329	265
F15	50	7,2	529	14	115	51	481	371	324
F16	50	7,0	522	-	172	87	507	405	339

W = semana, M = mes * Por debajo del límite de detección.

Tabla 31. Efecto de la sal y el pH en la actividad enzimática de rHuPH20 a 5 °C

Form. n.º	NaCl (mM)	pH	t = 0	Actividad enzimática (U/ml)				
				2 W	1M	5M	9M	12M
F1	140	7,6	588	613	597	595	524	539
F2	140	7,4	593	572	594	586	542	551
F3	140	7,2	583	563	592	586	537	546
F4	140	7,0	576	569	586	582	555	559
F5	110	7,6	577	569	582	582	532	552
F6	110	7,4	574	655	592	618	560	580
F7	110	7,2	581	574	581	593	553	553
F8	110	7,0	580	564	588	615	551	576
F9	80	7,6	599	540	584	546	515	534

Tabla 31. Efecto de la sal y el pH en la actividad enzimática de rHuPH20 a 5 °C

Form. n.º	NaCl (mM)	pH	t = 0	Actividad enzimática (U/ml)				
				2 W	1M	5M	9M	12M
F10	80	7,4	574	613	557	565	510	488
F11	80	7,2	544	536	548	566	518	536
F12	80	7,0	549	536	548	575	514	520
F13	50	7,6	526	518	514	508	465	456
F14	50	7,4	535	521	525	527	466	473
F15	50	7,2	529	518	544	482	452	456
F16	50	7,0	522	574	543	494	437	438

W = semana, M = mes

Tabla 32. Efecto de la sal y el pH en el % de recuperación de rHuPH20

Form. n.º	NaCl (mM)	pH	% de recuperación de rHuPH20					
			35 °C 1W	30 °C 2W	25 °C 1M	5 °C 1M	5 °C 9M	5 °C 12M
F1	140	7,6	41,90	52,70	70,78	101,78	94,05	76,91
F2	140	7,4	42,91	67,13	83,24	98,45	93,36	80,46
F3	140	7,2	49,99	68,94	89,84	102,18	102,07	75,42
F4	140	7,0	49,55	70,64	91,10	97,59	101,54	78,66
F5	110	7,6	37,50	53,04	82,95	96,95	92,45	81,42
F6	110	7,4	45,20	58,19	88,46	107,24	97,80	79,46
F7	110	7,2	42,96	59,21	86,68	93,10	108,11	80,83
F8	110	7,0	45,31	64,58	89,49	102,01	92,18	85,45
F9	80	7,6	42,91	56,60	73,76	90,92	92,18	78,13
F10	80	7,4	34,26	53,21	73,82	88,45	98,33	75,11
F11	80	7,2	38,33	59,21	82,78	87,93	95,23	78,77
F12	80	7,0	37,83	56,55	78,93	97,18	101,16	74,05
F13	50	7,6	34,87	49,07	42,13	87,93	83,47	69,38
F14	50	7,4	40,29	52,53	60,91	92,41	90,85	71,76
F15	50	7,2	39,56	52,47	69,92	87,76	91,54	73,41
F16	50	7,0	38,50	50,55	72,96	97,30	93,52	74,10

W = semana, M = mes

Ejemplo 9

5 Efecto del NaCl y el pH en la estabilidad de insulina y la actividad enzimática de rHuPH20 en diferentes combinaciones de conservantes

En este ejemplo, se determinaron los efectos del NaCl y el pH en la estabilidad de la insulina (insulina regular) y/o el análogo de insulina (lispro o aspart) y la actividad enzimática de rHuPH20 para diversas condiciones de almacenamiento, incluyendo almacenamiento a corto plazo y a largo plazo (7 días, 5 meses o 9 meses) a 2-8 °C y almacenamiento a corto plazo (un mes o menos) a temperaturas elevadas, incluyendo 35 °C, 30 °C y 25 °C.

Las formulaciones básicas se exponen en las secciones A-C a continuación. Para cada estudio individual, se variaron el pH y la concentración de NaCl mientras que permanecieron iguales los otros componentes de las composiciones. Para preparar las muestras para cada uno de insulina/análogos de insulina a cada una de las combinaciones de conservante predeterminadas, se prepararon 4 soluciones madre para cada uno de insulina y/o análogos de insulina. Las soluciones madre de insulina y de análogo de insulina se prepararon tal como se describe en el ejemplo 1 anterior, ajustando el pH final de insulina a 7,6. Cada solución madre contenía los niveles adecuados de conservantes y concentraciones de NaCl (50, 80, 110 o 140 mM), y todos los demás componentes comunes que se añadieron a sus concentraciones finales. El pH de cada solución madre se tituló con NaOH 1 N o 0,1 N de 7,6 hasta el pH diana final, secuencialmente. La precisión del pH se controló a $\pm 0,02$. Cada vez que se alcanzó el pH designado, se extrajo 1 ml de la solución, se filtró a través de un filtro PES de 0,2 micrómetros, y se cargó en un vial de vidrio de tipo I de 2 ml. Una vez que se prepararon todas las muestras, se almacenaron a 2-8 °C hasta que se llevaron a cabo las pruebas.

A. Estudio factorial completo para los efectos del NaCl y el pH en la solubilidad de la insulina/análogo de insulina a 2-8 °C durante 7 días

En este ejemplo, se empleó un diseño de estudio factorial completo para determinar los efectos del NaCl y el pH en la solubilidad de la insulina regular y de los análogos lispro o aspart en presencia de diferentes combinaciones de conservantes. Otros componentes de la formulación, excepto el pH, NaCl y conservantes, se mantuvieron constantes a: 120 U/ml de insulina/análogo de insulina, 5 µg/ml de rHuPH20 (600 U/ml), Tris/HCl 20 mM (Trizma,

Sigma, n.º de cat. T6066), Pluronic® F68 al 0,02 % (Poloxamer 188, Spectrum, n.º de cat. P1169), y ZnCl₂ 0,1 mM (EMD, n.º de cat. ZX0065-1). Se utilizaron tres combinaciones diferentes de niveles de conservante: 1) m-cresol al 0,15 % (Fluka, n.º de cat. 65996) y fenol al 0,2 % (Riedel-dh Haen, 16017, compendios múltiples); 2) m-cresol al 0,15 % y fenol al 0,15 %; y 3) m-cresol al 0,15 % y metilparabeno al 0,2 % (Fluka, n.º de cat. 85265). Con cada combinación de conservante, se generó una combinación completa de 6 niveles de pH y 4 niveles de concentraciones de NaCl (un total de 24 muestras). Los valores de pH ensayados fueron 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4 y 7,6. Las concentraciones de NaCl ensayadas fueron 50, 80, 110 y 140 mM.

Se llevó a cabo HPLC de fase reversa (RP-HPLC) tal como se describe en el ejemplo 3 anterior con las siguientes modificaciones. La fase móvil comenzó con ácido trifluoroacético (TFA) del 75 % al 0,1 % en agua (A) y TFA en acetonitrilo del 25 % al 0,1 % (B) con un gradiente lineal a 68 % de A + 32 % de B durante 16 minutos, con una retención durante 4 minutos, seguido de un aumento lineal al 100 % de B durante 5 minutos. Los resultados se muestran en las tablas 33-35 a continuación, que exponen la solubilidad, expresada como % restante de la concentración inicial (120 U/ml), tras su almacenamiento a 2-8 °C durante 7 días. La tabla 33 expone los resultados para Lispro. La tabla 34 expone los resultados para insulina regular. La tabla 35 expone los resultados para insulina Aspart.

Las tres moléculas de insulina/análogo de insulina respondieron de manera similar al pH y la concentración de NaCl. A bajo pH y altas concentraciones de NaCl, la insulina/análogos de insulina formaron cristales y precipitados, tal como se indica por una disminución en el porcentaje de insulina/análogo de insulina restante. Estos resultados se verificaron mediante inspección visual. Las tres insulinas/análogos de insulina fueron solubles en todas las combinaciones de conservante para pH ≥ 7,2 a 50 mM de NaCl, pH ≥ 7,4 a 80 mM de NaCl y a pH ≥ 7,6 a 110 mM de NaCl. De manera similar, las tres insulinas/análogos de insulina no fueron adecuadamente solubles (concentración observada de < 90 U/ml o 75 %) para un pH ≤ 6,8 a 140 mM de NaCl y pH 6,6 tanto a 80 como a 110 mM de NaCl. Las tendencias exactas de solubilidad variaron entre las tres insulinas/análogos de insulina. En las condiciones ensayadas, la insulina Aspart fue la más soluble seguido de la insulina Lispro y la insulina regular, que fue la menos soluble. También hubo diferencias en la compatibilidad del conservante, siendo la insulina Aspart y la insulina regular más solubles en fenol al 0,15 % y m-cresol al 0,15 % y la insulina Lispro la más soluble en m-cresol al 0,15 % y metilparabeno al 0,2 %. El metilparabeno parece ser un mejor conservante cuando la concentración de sal es baja, sin embargo, a mayores concentraciones de sal, no se observó diferencia entre muestras que contenían fenol o metilparabeno.

La insulina regular no se disolvió completamente a concentraciones mayores de NaCl (> 110 mM), incluso a alto pH. La tabla 34 confirma la baja solubilidad de la insulina, teniendo más del 50 % de las condiciones de ensayo concentraciones de insulina por debajo del 90 % de los valores originales tras solo 7 días a 2-8 °C. La reducción de la concentración de fenol y/o el reemplazo del fenol por metilparabeno aumenta ligeramente la solubilidad. En estos experimentos, la pérdida de solubilidad acompañada de un aumento de 30 mM en la concentración de NaCl fue comparable a una reducción de pH de 0,2 unidades. Estos datos demuestran que las altas concentraciones de NaCl afectarán a la solubilidad de la insulina durante su almacenamiento a 5 °C y por lo tanto es probable que las formulaciones de insulina regular requieran una concentración de NaCl reducida y/o un pH aumentado en relación a los análogos de insulina.

Tabla 33. Solubilidad de Lispro tras 7 días a 2-8 °C				
Formulación de 0,2 % de fenol + 0,15 % de m-cresol				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
7,6	97,5	97,7	97,3	96,8
7,4	97,7	97,6	97,0	96,9
7,2	97,6	97,4	95,2	90,8
7,0	97,4	95,5	75,2	65,3
6,8	91,4	65,1	44,9	40,4
6,6	52,8	32,8	26,0	N/A
Formulación de 0,15 % de fenol + 0,15 % de m-cresol				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
7,6	100,9	102,1	101,6	101,3
7,4	100,8	101,8	100,7	98,4
7,2	100,5	99,2	97,3	93,1
7,0	98,7	96,4	77,0	61,2
6,8	93,6	60,8	44,9	35,9
6,6	60,3	43,3	24,2	27,7
7,6	95,7	98,3	100,2	98,8
7,4	95,6	98,2	99,9	98,5
7,2	95,7	97,9	99,6	98,0
7,0	95,3	98,1	94,1	65,6

6,8	82,3	62,6	47,8	42,0
6,6	42,0	28,2	24,1	25,9

Tabla 34. Solubilidad de insulina regular tras 7 días a 2-8 °C

Formulación de 0,2 % de fenol + 0,15 % de m-cresol				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
7,6	102,1	99,2	98,5	82,2
7,4	101,8	99,2	87,8	40,6
7,2	101,8	92,2	37,4	18,9
7,0	100,3	35,7	17,7	11,6
6,8	38,4	17,1	10,2	6,5
6,6	26,8	8,7	6,5	5,8
Formulación de 0,15 % de fenol + 0,15 % de m-cresol				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
7,6	97,2	97,1	97,1	91,7
7,4	96,7	97,3	94,2	57,9
7,2	97,0	96,4	58,7	33,1
7,0	96,7	80,8	32,9	17,1
6,8	66,6	24,9	17,0	10,2
6,6	31,2	18,6	14,6	12,9
Formulación de 0,2 % de metilparabeno + 0,15 % de m-cresol				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
7,6	98,1	97,9	97,0	95,4
7,4	98,1	97,7	94,6	59,1
7,2	98,0	90,6	47,1	32,9
7,0	86,9	46,6	23,0	15,9
Formulación de 0,2 % de metilparabeno + 0,15 % de m-cresol				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
6,8	34,1	19,0	11,4	10,2
6,6	15,3	9,0	7,4	5,8

Tabla 35. Solubilidad de insulina Aspart tras 7 días a 2-8 °C

Formulación de 0,2 % de fenol + 0,15 % de m-cresol				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
7,6	99,2	100,8	100,2	99,8
7,4	99,2	100,6	100,0	99,7
7,2	99,1	100,5	100,0	99,7
7,0	99,1	100,6	99,9	88,9
6,8	98,8	91,8	72,8	50,9
6,6	91,8	59,2	58,0	39,3
Formulación de 0,15 % de fenol + 0,15 % de m-cresol				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
7,6	100,1	99,7	99,4	101,1
7,4	100,0	99,6	99,5	101,1
7,2	99,1	99,2	99,2	101,1
7,0	99,7	99,3	99,3	100,2
6,8	99,8	97,9	97,5	60,5
6,6	97,9	86,3	54,4	38,3
Formulación de 0,2 % de metilparabeno + 0,15 % de m-cresol				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
7,6	99,3	100,6	99,8	99,8

7,4	99,1	100,5	99,6	99,6
7,2	99,0	100,2	99,5	101,6
7,0	98,7	100,2	96,3	67,9
6,8	97,2	84,1	54,2	32,2
6,6	57,7	32,1	21,1	14,7

B. Estudio de seguimiento con nivel reducido de m-cresol

La solubilidad de la insulina se evaluó adicionalmente en un estudio de seguimiento simplificado con un nivel de m-cresol reducido. Se utilizaron cuatro combinaciones de niveles de conservante: 1) m-cresol al 0,1 % y fenol al 0,15 %; 2) m-cresol al 0,1 % y fenol al 0,2 %; 3) m-cresol al 0,1 % y metilparabeno al 0,15 %; y 4) m-cresol al 0,1 % y metilparabeno al 0,2 %. Se evaluaron dos niveles de pH (7,3 y 7,1) y dos concentraciones de NaCl (120 y 100 mM). Los demás componentes de la formulación se mantuvieron constantes a: 120 U/ml de insulina regular, 5 µg/ml de rHuPH20 (600 U/ml), Tris/HCl 20 mM (Trizma, Sigma, n.º de cat. T6066), poloxamer 188 al 0,02 % (Poloxamer 188, Spectrum, n.º de cat. P1169), y ZnCl₂ 0,1 mM (EMD, n.º de cat. ZX0065-1). Las formulaciones se prepararon y ensayaron tal como se describe anteriormente.

Los resultados se exponen en la tabla 36 a continuación. La solubilidad general de la insulina regular aumenta ligeramente en presencia de cantidades menores de m-cresol, y además, cuando el fenol se reemplaza con metilparabeno.

Tabla 36. Solubilidad de insulina regular con niveles reducidos de m-cresol a 2-8 °C

Formulación n.º	pH	NaCl (mM)	m-cresol (%)	Fenol (%)	Metilparabeno (%)	Recuperación de insulina	
						1 día	3 días
1	7,3	120	0,1	0,15	-	84,15	52,13
2	7,3	120	0,1	0,2	-	72,75	40,78
3	7,3	120	0,1	-	0,15	92,88	92,68
4	7,3	120	0,1	-	0,2	94,76	94,80
5	7,1	100	0,1	0,15	-	72,60	38,87
6	7,1	100	0,1	0,2	-	64,86	32,69
7	7,1	100	0,1	-	0,15	93,87	91,99
8	7,1	100	0,1	-	0,2	92,32	90,59

C. Efecto a largo plazo del pH y el NaCl en la estabilidad de rHuPH20 e insulina

En este ejemplo, se empleó un diseño de estudio factorial completo para determinar los efectos del pH y el NaCl en la solubilidad de la insulina regular y rHuPH20 para identificar una condición que maximice la solubilidad de la insulina a 2-8 °C y maximice la estabilidad de rHuPH20 a temperatura ambiente o mayor a un alto nivel de conservante. El nivel de conservante se ajustó para cumplir con los criterios EPA. Se evaluaron cuatro niveles de concentraciones de NaCl y 4 niveles de pH generando un total de 16 muestras. Se evaluó la estabilidad de las en condiciones tanto aceleradas a corto plazo (alta temperatura) como de almacenamiento a largo plazo a 2-8 °C.

La insulina regular (100 U/ml, preparada tal como se describe en el ejemplo 1 anterior, con un pH final de 7,0) y 5 µg/ml de rHuPH20 se formularon en un tampón común que contenía Tris/HCl 20 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, Poloxamer 188 al 0,01 %, m-cresol al 0,15 % y fenol al 0,2 %. La solubilidad se determinó mediante RP-HPLC tal como se describe en el ejemplo 3 anterior. La solubilidad se expresó como el porcentaje relativo en comparación con el patrón, siendo 100 U/ml el 100 %. La actividad enzimática de rHuPH20 se evaluó tal como se describe en el ejemplo 2 anterior. Se usó RP-HPLC para controlar el contenido total y la pureza de rHuPH20 (véase el ejemplo 3 anterior). Los datos se procesaron con el programa informático Design Expert 7.0 (StatEase). Los análisis ANOVA y de correlación se llevaron a cabo con el programa informático JMP 8.0.

Los resultados se exponen en las tablas 37-42 a continuación. Las tablas 37-38 exponen la actividad enzimática de rHuPH20 y la tabla 39 expone el porcentaje de recuperación de rHuPH20. En condiciones aceleradas a corto plazo, la actividad enzimática de rHuPH20 se vio afectada por el pH, el NaCl y las temperaturas de almacenamiento, según se indica en la tabla 37 a continuación. Tras 1 semana de almacenamiento a 35 °C, no quedaba actividad de rHuPH20 significativa. La actividad enzimática tras almacenamiento a 30 °C se mejoró en comparación a 35 °C, pero la única formulación que retenía >375 U/ml tenía una alta concentración de NaCl (140 mM) y bajo pH (7,0). En general, cuanto mayor sea el pH y menor la concentración de sal, menor será la actividad enzimática. A una temperatura de almacenamiento de 25 °C, se redujo en gran medida el efecto en la actividad enzimática de rHuPH20, aunque permanecieron las tendencias observadas para 30 °C, especialmente para las formulaciones que tienen baja sal y alto pH. Una mayoría de las formulaciones mantuvieron la actividad enzimática por encima del criterio fijado de 375 U/ml en el instante de 4 semanas. A 5 °C no hubo esencialmente pérdidas en la actividad enzimática de rHuPH20, incluso tras su almacenamiento durante 1 mes. Esta tendencia continuó durante 9 meses de almacenamiento a 2-8 °C, tal como se observa en la tabla 38 a continuación. En resumen, rHuPH20 mantuvo la

actividad enzimática cuando se almacenó a 25 °C o una temperatura menor, especialmente cuando la concentración de NaCl se mantiene por encima de 80 mM. La estabilidad se reduce rápidamente a temperaturas mayores de 25 °C. Se usó RP-HPLC para controlar el contenido total de rHuPH20 y su pureza. Tal como se observa en la tabla 39 a continuación, la pérdida de actividad enzimática está correlacionada con la pérdida de contenido de rHuPH20 (análisis estadístico, p<0,001). Un análisis de la pureza de rHuPH20 no reveló tendencias o diferencias significativas en los valores de pureza de área de pico relativos para el área del pico principal de rHuPH20 (datos no mostrados), lo que indica que la pureza es consistente y que por lo tanto, la pérdida de actividad se debe a una pérdida de contenido total. La pérdida de contenido se debe probablemente al desplegamiento de la proteína a altas concentraciones de conservante y temperaturas, dando lugar a la agregación y precipitación de rHuPH20.

Las tablas 40-41 exponen el porcentaje del pico principal de insulina y el porcentaje de recuperación de insulina tras almacenamiento a largo plazo a 2-8 °C. En la tabla 38, el porcentaje de recuperación de insulina se basó en la suma del pico principal de insulina y del pico de desamido. Tal como se muestra en la Tabla 40, el porcentaje del pico principal de insulina permaneció alto (aproximadamente el 97 %) sin cambios significativos, lo que indica que la pérdida no se debió a la degradación química o física de la insulina, tal como desamidación o agregación. La inspección visual de los viales indicó mezclas de pequeños granos brillantes o de partículas cristalinas transparentes o partículas pseudocristalinas con una solución nebulosa ocasional. Los datos en la tabla 41 resumen el contenido de insulina restante en solución en la formulación en cada instante. La recuperación de insulina en comparación con las condiciones iniciales es una indicación de la solubilidad. La precipitación/cristalización de insulina varió dependiendo de los intervalos de pH y concentraciones de NaCl ensayadas. En general, cuando el pH era bajo y la concentración de sal alta (condiciones que favorecen la actividad de rHuPH20), la insulina formó cristales muy rápidamente y alcanzó condiciones de equilibrio en un par de meses. A bajas concentraciones de sal y alto pH, la cristalización fue lenta y la mayoría de las moléculas de insulina permanecieron en solución a los 9 meses. Los análisis estadísticos (véase la tabla 42 a continuación) de los datos de recuperación de insulina demuestran que el pH, NaCl, tiempo, pH*NaCl y NaCl*tiempo influyen todos significativamente la solubilidad de la insulina. Estos resultados indicaron que la solubilidad de la insulina durante periodos de tiempo extendidos es dependiente de alto pH (mayor de 7,4) y bajo NaCl (menor de 80 mM), en contraste directo a las condiciones que mantienen la actividad enzimática de rHuPH20.

Tabla 37. Actividad enzimática de rHuPH20

n.º	NaCl, mM	pH	T = 0	Actividad de rHuPH20 (U/ml)							
				35 °C		30 °C		25 °C		5 °C	
				1 W	1 W	2 W	1 W	2 W	1M	2 W	1M
1	140	7,6	588	---	244	133	545	528	461	613	597
2	140	7,4	593	15	322	238	557	494	496	572	594
3	140	7,2	583	31	370	300	585	530	514	563	592
4	140	7,0	576	84	418	387	579	507	513	569	586
5	110	7,6	577	-	163	73	525	496	412	569	582
6	110	7,4	574	-	256	159	541	489	449	655	592
7	110	7,2	581	14	327	257	565	501	505	574	581
8	110	7,0	580	49	376	304	576	512	512	564	588
9	80	7,6	599	9	152	82	498	430	385	540	584
10	80	7,4	574	-	91	17	451	401	290	613	557
11	80	7,2	544	-	230	133	522	444	416	536	548
12	80	7,0	549	-	283	199	518	448	435	536	548
13	50	7,6	526	-	38	-	361	296	178	518	514
14	50	7,4	535	-	47	5	426	329	265	521	525
15	50	7,2	529	14	115	51	481	371	324	518	544
16	50	7,0	522	-	172	87	507	405	339	574	543

— Por debajo del límite de detección

Tabla 38. Actividad enzimática de rHuPH20 tras almacenamiento a largo plazo a 2-8 °C

5 meses				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
7,6	508,0571	546,4209	581,6326	594,6197
7,4	526,6628	564,7769	618,3856	585,9813
7,2	481,6035	566,2521	593,2027	585,9948
7,0	494,4796	575,3274	615,3546	582,4274
9 meses				
pH	Concentración de NaCl (mM)			
	50	80	110	140
7,6	464,8964	515,3382	531,9202	523,5385

7,4	466,1871	509,9032	560,4847	542,4534
7,2	451,8324	518,0740	553,1847	536,7846
7,0	436,5115	513,9692	551,0218	554,6513

Tabla 39. Porcentaje de recuperación de rHuPH20

n.º	NaCl, mM	pH	% de recuperación de rHuPH20*				
			35 °C, 1 W	30 °C, 2 W	25 °C, 4 W	5 °C, 1M	5 °C, 9M
1	140	7,6	41,90	52,70	70,78	101,78	94,05
2	140	7,4	42,91	67,13	83,24	98,45	93,36
3	140	7,2	49,99	68,94	89,84	102,18	102,07
4	140	7,0	49,55	70,64	91,10	97,59	101,54
5	110	7,6	37,50	53,04	82,95	96,95	92,45
6	110	7,4	45,20	58,19	88,46	107,24	97,80
7	110	7,2	42,96	59,21	86,68	93,10	108,11
8	110	7,0	45,31	64,58	89,49	102,01	92,18
9	80	7,6	42,91	56,60	73,76	90,92	92,18
10	80	7,4	34,26	53,21	73,82	88,45	98,33
11	80	7,2	38,33	59,21	82,78	87,93	95,23
12	80	7,0	37,83	56,55	78,93	97,18	101,16
13	50	7,6	34,87	49,07	42,13	87,93	83,47
14	50	7,4	40,29	52,53	60,91	92,41	90,85
15	50	7,2	39,56	52,47	69,92	87,76	91,54
16	50	7,0	38,50	50,55	72,96	97,30	93,52

* El % de recuperación se basó en el área de pico medida total en comparación con un patrón de referencia conocido.

Tabla 40. Porcentaje del pico principal de insulina tras almacenamiento a largo plazo a 2-8 °C

NaCl 140 mM							
pH	Tiempo (meses)						
	0	0,25	0,5	1	3	5	9
7,6	97,64	97,61	97,41	97,51	97,35	97,56	97,07
7,4	97,64	97,57	97,33	97,23	97,38	97,73	96,10
7,2	97,56	97,37	96,98	96,62	96,60	98,04	95,49
7,0	97,65	97,15	97,05	96,39	96,16	97,97	95,17
NaCl 110 mM							
pH	Tiempo (meses)						
	0	0,25	0,5	1	3	5	9
7,6	97,58	97,57	97,60	97,52	97,42	97,61	97,31
7,4	97,65	97,58	97,39	97,36	97,36	97,79	96,91
7,2	97,62	97,46	97,35	97,03	97,49	97,61	95,91
7,0	97,64	97,31	97,57	96,64	96,10	97,79	95,03
NaCl 80 mM							
pH	Tiempo (meses)						
	0	0,25	0,5	1	3	5	9
7,6	97,63	97,62	97,52	97,37	97,64	97,67	97,31
7,4	97,56	97,61	97,51	97,43	97,43	97,75	97,29
7,2	97,57	97,59	97,30	97,45	97,34	97,64	97,00
7,0	97,65	97,50	97,30	97,20	97,04	97,81	96,18
NaCl 50 mM							
pH	Tiempo (meses)						
	0	0,25	0,5	1	3	5	9
7,6	97,65	97,58	97,33	97,44	97,35	97,66	97,34
7,4	97,58	97,54	97,48	97,47	97,45	97,74	97,27
7,2	97,64	97,59	97,56	97,46	97,47	97,75	97,27
7,0	97,64	97,59	97,50	97,44	97,24	97,73	97,20

Tabla 41. Porcentaje de recuperación de insulina tras almacenamiento a largo plazo a 2-8 °C

NaCl 140 mM							
pH	Tiempo (meses)						
	0	0,25	0,5	1	3	5	9
7,6	95,73	95,53	94,46	87,46	64,62	67,99	46,20

Tabla 41. Porcentaje de recuperación de insulina tras almacenamiento a largo plazo a 2-8 °C							
NaCl 140 mM							
pH	Tiempo (meses)						
	0	0,25	0,5	1	3	5	9
7,4	95,73	83,13	50,31	39,27	37,45	34,80	27,30
7,2	95,82	37,37	25,12	23,62	19,03	17,15	15,99
7,0	95,78	21,70	15,04	13,80	11,11	11,14	11,13
7,6	95,47	96,74	96,40	96,35	95,89	95,50	84,82
7,4	96,69	96,86	93,50	74,63	63,68	68,64	43,83
7,2	96,45	66,09	39,64	32,94	58,68	28,02	23,68
7,0	96,35	31,18	19,52	18,50	15,05	14,72	14,23
NaCl 80 mM							
pH	Tiempo (meses)						
	0	0,25	0,5	1	3	5	9
7,6	95,48	95,96	96,22	96,34	95,43	96,17	96,91
7,4	96,34	96,51	96,49	96,64	96,05	96,25	98,62
7,2	96,50	96,06	95,81	86,34	60,90	61,48	50,74
7,0	96,36	64,78	40,76	35,90	33,47	32,72	29,34
NaCl 50 mM							
pH	Tiempo (meses)						
	0	0,25	0,5	1	3	5	9
7,6	95,66	96,72	97,02	96,38	96,21	96,71	98,74
7,4	96,74	96,44	96,36	95,89	95,90	96,58	98,78
7,2	96,68	95,95	95,80	95,42	95,64	96,28	98,59
7,0	96,41	95,91	95,12	93,26	81,51	88,84	72,51

Tabla 42. Análisis estadísticos					
Análisis de la varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Relación F	
Modelo	6	82776,03	13796,0	51,2972	
Error	105	28239,00	268,9	Prob. > F	
C. Total	111	111015,02		< 0,0001*	
Pruebas de efecto					
Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	Relación F	Prob. > F
pH	1	1	30142,891	112,0792	< 0,0001*
NaCl	1	1	35065,510	130,3828	< 0,0001*
pH*NaCl	1	1	4786,627	17,7979	< 0,0001*
Tiempo	1	1	9068,524	33,7192	< 0,0001*
pH*Tiempo	1	1	752,462	2,7979	0,0974
NaCl*Tiempo	1	1	2960,012	11,0061	0,0012*

*significativo

Ejemplo 10**5 Desarrollo de la formulación de análogo de insulina: Exploración de estabilizante para insulina formulada con rHuPH20**

Los conservantes protegen contra la potencial contaminación microbiana de la insulina que es posible debido a múltiples dosis. Los conservantes típicos son m-cresol, fenol y parabenos. Estos conservantes sirven como agentes antimicrobianos, pero también sirven para estabilizar estructuras de orden mayor de insulina. Se ha demostrado que los conservantes fenólicos reducen la estabilidad de rHuPH20 (véase el ejemplo 7). En este ejemplo, se exploraron diversos estabilizantes respecto de su capacidad para prevenir la degradación de rHuPH20 en presencia de conservantes fenólicos a la vez que se mantiene la estabilidad de la insulina/análogo de insulina. Los estabilizantes que se exploraron incluyen excipientes farmacéuticos de uso común, incluyendo aminoácidos y sus derivados, sales y especies de tampón, polioles y otros compuestos. La estabilidad se determinó mediante la actividad enzimática de rHuPH20 y la solubilidad de la insulina. Los efectos estabilizantes específicos incluyeron la prevención de la pérdida adsorptiva y/o la oxidación de rHuPH20 y los efectos estabilizantes generales medidos mediante la actividad enzimática de rHuPH20.

20 A. Efecto de diversos tensioactivos en la actividad enzimática de rHuPH20

- Varios tensioactivos comunes, a saber, polisorbato 80 (PS80), polisorbato 20 (PS20) y poloxamer 188 (Pluronic® F68) se exploraron respecto de su capacidad para preservar las formulaciones de rHuPH20. Todas las formulaciones contenían 100 µg/ml de rHuPH20 (12.000 U) y NaCl 150 mM a pH 6,5. Las formulaciones variaron en el tensioactivo y concentración de tensioactivo y del tampón (ya sea histidina o fosfato). Las formulaciones se sometieron a agitación a 35 °C durante 10 días, analizándose las muestras respecto de la actividad de rHuPH20 en los días 3 y 10. La actividad enzimática de rHuPH20 se determinó tal como se describe en el ejemplo 2 anterior. La estabilidad de rHuPH20 se determinó midiendo el pico de oxidación de rHuPH20 mediante RP-HPLC y mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (véanse los ejemplos 3 y 4 anteriores).
- Las formulaciones y resultados de la actividad enzimática de rHuPH20 se exponen en la tabla 43 a continuación. Un análisis ANOVA de la oxidación de rHuPH20 medida mediante RP-HPLC no muestra una diferencia significativa en la actividad enzimática con respecto al tipo de tensioactivo, la concentración de tensioactivo, el tampón o el tiempo de agitación ($F = 0,6832$, $p = 0,6397$). Además, Los resultados de la SEC no mostraron diferencias detectables en los tamaños de los picos principales (datos no mostrados).
- Los resultados de la oxidación de rHuPH20 se exponen en la tabla 44 a continuación. Los resultados muestran que el área del pico de oxidación aumentó con niveles crecientes de tensioactivo y tiempo de agitación. Se sabe que el polisorbato 20 contiene cantidades medibles de actividad de peróxido (véase, por ejemplo, Donbrow et al., (1978) J. Pharm Sci. 67(12):1676-1681, o Kibbe, A.H., ed. (2000) Handbook of Pharmaceutical Excipients. 3ª Edición, American Pharmaceutical Association & Pharmaceutical Press: Washington, DC y Londres, R.U.). En este estudio, el polisorbato 20 usado fue un lote antiguo que dio como resultado alta oxidación de rHuPH20; por el contrario, el poloxamer 188 causó solo cantidades residuales de oxidación. El análisis multivariable de la varianza indicó que el tiempo de agitación así como el tipo y concentración de tensioactivo afectaron al nivel de oxidación de rHuPH20 (véase la tabla 45 a continuación). Asimismo, fueron significativos los términos de interacción, incluyendo tensioactivo frente a concentración, tensioactivo frente al tiempo y concentración frente al tiempo.
- Basándose en estos resultados, es evidente que la adición de tensioactivo en las formulaciones de rHuPH20 podía reducir de manera eficaz la pérdida de rHuPH20, presumiblemente debido a la pérdida de adsorción y la posible desnaturalización en la interfaz aire-agua. Sin embargo, un potencial inconveniente de la adición de tensioactivo es que puede aumentar la oxidación para rHuPH20.

Tabla 43. Efecto de PS80, PS20 y F68 en la actividad enzimática de rHuPH20

n.º	Tensioactivo, conc (% p/v)	Tampón	Actividad enzimática (U/ml)	
			Agitado 3 días	Agitado 10 días
1	PS80, 0,1 %	histidina 50 mM	11.515	11.444
2	PS80, 0,01 %	histidina 50 mM	10.370	10.358
3	PS80, 0,001 %	histidina 50 mM	9.758	9.850
4	PS20, 0,1 %	histidina 50 mM	9.993	7.990
5	PS20, 0,01 %	histidina 50 mM	10.566	10.448
6	PS20, 0,001 %	histidina 50 mM	8.644	8.488
7	F68, 0,1 %	histidina 50 mM	10.460	9.580
8	F68, 0,01 %	histidina 50 mM	10.537	10.064
9	F68, 0,001 %	histidina 50 mM	9.148	8.811
10	PS80, 0,1 %	fosfato 50 mM	10.473	7.459
11	PS80, 0,01 %	fosfato 50 mM	10.590	10.919
12	PS80, 0,001 %	fosfato 50 mM	9.233	9.858
13	PS20, 0,1 %	fosfato 50 mM	9.839	9.004
14	PS20, 0,01 %	fosfato 50 mM	10.659	11.241
15	PS20, 0,001 %	fosfato 50 mM	9.161	9.770
16	F68, 0,1 %	fosfato 50 mM	11.274	11.197
17	F68, 0,01 %	fosfato 50 mM	10.669	10.459
18	F68, 0,001 %	fosfato 50 mM	9.605	9.655

Tabla 44. Efecto de PS80, PS20 y F68 en la oxidación de rHuPH20

n.º	Tensioactivo, conc (% p/v)	Tampón	% de pico de oxidación	
			Agitado 3 días	Agitado 10 días
1	PS80, 0,1 %	histidina 50 mM	6,89	8,5
2	PS80, 0,01 %	histidina 50 mM	4,35	4,89
3	PS80, 0,001 %	histidina 50 mM	3,82	3,94
4	PS20, 0,1 %	histidina 50 mM	44,13	74,39
5	PS20, 0,01 %	histidina 50 mM	10,01	14,21
6	PS20, 0,001 %	histidina 50 mM	4,56	4,91
7	F68, 0,1 %	histidina 50 mM	4,52	17,63
8	F68, 0,01 %	histidina 50 mM	3,83	5,38

n.º	Tensioactivo, conc (% p/v)	Tampón	% de pico de oxidación	
			Agitado 3 días	Agitado 10 días
9	F68, 0,001 %	histidina 50 mM	3,79	4,31
10	PS80, 0,1 %	fosfato 50 mM	5,41	12,40
11	PS80, 0,01 %	fosfato 50 mM	3,83	5,01
12	PS80, 0,001 %	fosfato 50 mM	3,41	4,62
13	PS20, 0,1 %	fosfato 50 mM	43,79	65,34
14	PS20, 0,01 %	fosfato 50 mM	10,32	12,48
15	PS20, 0,001 %	fosfato 50 mM	4,25	5,15
16	F68, 0,1 %	fosfato 50 mM	6,11	6,29
17	F68, 0,01 %	fosfato 50 mM	3,80	4,72
18	F68, 0,001 %	fosfato 50 mM	3,61	4,21

Resumen del ajuste					
Rcuadrado	0,975911				
Ajuste de Rcuadrado	0,959852				
Error cuadrático medio	3,423151				
Media de respuesta	11,91222				
Observaciones (o sumas ponderadas) 36					
Análisis de la varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Relación F	
Modelo	14	9969,264	712,090	60,7691	
Error	21	246,077	11,718	Prob. > F	
C. Total	35	10215,341		< 0,0001*	
Pruebas de efecto					
Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	Relación F	Prob. > F
tensioactivo	2	2	909,4801	38,8071	< 0,0001*
tampón	1	1	0,1152	0,0098	0,9220
conc.	1	1	741,1067	63,2454	< 0,0001*
Tiempo	1	1	214,5248	18,3074	0,0003*
tensioactivo*tampón	2	2	20,3784	0,8695	0,4337
tensioactivo*conc.	2	2	3557,3392	151,7900	< 0,0001*
tensioactivo*tiempo	2	2	114,0738	4,8675	0,0183*
tampón*conc.	1	1	14,8438	1,2668	0,2731
tampón*tiempo	1	1	10,4329	0,8903	0,3561
conc.*tiempo	1	1	248,4121	21,1993	0,0002*
*significativo					

B. Metionina

5 1. Efecto de la metionina para prevenir la oxidación de rHuPH20

rHuPH20 tiene dos sitios potenciales de oxidación: Met458 y Met35. El pico "ox-1" corresponde a Met458 y es el pico principal de oxidación cuando se ensaya mediante RP-HPLC. El pico "ox-2" contiene ambas oxidaciones de metionina. La oxidación de la metionina puede evitarse mediante la adición de metionina libre como secuestrante para reaccionar con potenciales compuestos oxidativos.

a. Formulaciones de rHuPH20

En este estudio, se evaluó el efecto de la adición de metionina libre en la oxidación de rHuPH20 en presencia de polisorbato 20, polisorbato 80 y/o poloxamer 188. Cada formulación contenía 5 µg/ml de rHuPH20, un 0,02 % del tensioactivo indicado, fosfato 50 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM y metionina (de 0 a 50 mM). Las muestras se incubaron a 30 °C durante 72 horas y se examinaron mediante RP-HPLC tal como se expone en el ejemplo 3 anterior. Los resultados se exponen en la tabla 46 a continuación. Los análisis estadísticos se exponen en la tabla 47 a continuación. Los resultados indicaron que la metionina previene la oxidación de rHuPH20 a una concentración de 2 mM.

Metionina (mM)	% de pico de oxidación 1		
	Poloxamer 188	Polisorbato 20	Polisorbato 80
0	3,98	4,01	4,01
2	3,39	3,43	3,50
10	3,36	3,37	3,44
50	3,34	3,38	3,34

Resumen del ajuste					
Rcuadrado	0,993397				
Ajuste de Rcuadrado	0,987894				
Error cuadrático medio	0,030551				
Media de respuesta	3,545833				
Observaciones (o sumas ponderadas)	12				
Análisis de la varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Relación F	
Modelo	5	0,84249167	0,168498	180,5339	
Error	6	0,00560000	0,000933	Prob. > F	
C. Total	11	0,84809167		< 0,0001*	
Pruebas de efecto					
Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	Relación F	Prob. > F
Tensioactivo	2	2	0,00606667	3,2500	0,1106
Met	3	3	0,83642500	298,7232	< 0,0001*

*Significativo

b. Formulaciones de rHuPH20/insulina

5

La metionina se ensayó respecto de su capacidad para prevenir la oxidación de rHuPH20 en formulaciones de rHuPH20/insulina. Las formulaciones contenían 100 U/ml de insulina (Insulina Organon API, insulina humana recombinante SIHR 143, la solución se preparó tal como se describe en el ejemplo 1), 5 µg/ml de rHuPH20, Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 80 mM, Poloxamer 188 al 0,03 %, fenol al 0,1 % y m-cresol al 0,1 % en presencia o ausencia de metionina 40 mM. Las formulaciones se incubaron a 30 °C durante 5 semanas para evaluar el pico de oxidación de rHuPH20. Los resultados mostraron que el pico ox-1 fue significativamente más pequeño medido mediante RP-HPLC en formulaciones que contenían metionina en comparación con las formulaciones que no contenían metionina.

10

15 2. Metionina como estabilizante general

La metionina se evaluó adicionalmente respecto de su capacidad para prevenir la pérdida de actividad enzimática de rHuPH20 a mayor temperatura y contenido de conservante. Se llevó a cabo un estudio de metodología de superficie de respuesta (RSM) de diseño de experimento (DOE) para evaluar el efecto de la metionina en la actividad enzimática de rHuPH20 a diferentes niveles de concentración de NaCl y pH. Las formulaciones básicas contenían 100 U/ml de insulina (Insulina Organon API, insulina humana recombinante SIHR 143, la solución se preparó tal como se describe en el ejemplo 1), 5 µg/ml de rHuPH20, Tris/HCl 20 mM, m-cresol al 0,1 %, fenol al 0,1 % y poloxamer 188 al 0,01 %. El intervalo de concentración de metionina varió entre 40 y 80 mM, el intervalo de concentración de NaCl varió entre 70 y 110 mM y el intervalo de pH fue de entre 7,2 y 7,6. Las formulaciones se incubaron bien a 30 °C durante 4 semanas o 4 durante 5 días y se determinó la actividad enzimática de rHuPH20 tal como se expone en el ejemplo 2 anterior.

25

Los datos se exponen en la tabla 48 a continuación. Los análisis estadísticos de los datos se exponen en las tablas 49-50 a continuación. Los datos muestran que la concentración de NaCl tiene un efecto significativo en la estabilidad de rHuPH20 tanto a 30 °C como a 35 °C. El pH tiene un efecto significativo a 35 °C. La metionina no mostró efecto estabilizante en rHuPH20 entre 40 y 80 mM. Un estudio de seguimiento indicó que los resultados fueron los mismos en presencia o ausencia de metionina. Las formulaciones con una actividad enzimática inicial de rHuPH20 de 650 U/ml se redujeron a 525 y 522 U/ml para metionina 1 y 20 mM, respectivamente, tras su almacenamiento a 30 °C durante un mes. Por lo tanto, la metionina actúa como antioxidante, pero no mejora la estabilidad general de rHuPH20 frente al estrés del conservante y térmico.

35

Tabla 48. Efectos de la metionina, NaCl y pH en la actividad de rHuPH20 en las formulaciones de insulina-PH20

Met (mM)	NaCl (mM)	pH	Actividad de rHuPH20 (U/ml)	
			30 °C, 4 W	35 °C, 5 D
40	110	7,4	559	462
60	110	7,2	558	518
60	90	7,4	551	432
40	90	7,2	539	459
60	90	7,4	530	418
80	110	7,4	556	475
40	70	7,4	456	303
40	90	7,6	508	349
60	110	7,6	552	430
60	70	7,6	444	258
60	90	7,4	522	415
60	90	7,4	525	426
60	70	7,2	455	414
80	90	7,6	467	326
80	90	7,2	503	428
80	70	7,4	452	341
60	90	7,4	500	401

Tabla 49. Actividad de respuesta de HuPH20 medida después de almacenarla a 30 °C durante 2 semanas

Resumen del ajuste					
Rcuadrado	0,91826				
Ajuste de Rcuadrado	0,813165				
Error cuadrático medio	17,88843				
Media de respuesta	510,4541				
Observaciones (o sumas ponderadas)	17				
Análisis de la varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Relación F	
Modelo	9	25163,516	2795,95	8,7374	
Error	7	2239,972	320,00	Prob. > F	
C. Total	16	27403,488		0,0046*	
Pruebas de efecto					
Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	Relación F	Prob. > F
Met	1	1	884,795	2,7650	0,1403
NaCl	1	1	21696,424	67,8022	< 0,0001*
pH	1	1	882,210	2,7569	0,1408
Met*Met	1	1	349,423	1,0920	0,3308
Met*NaCl	1	1	0,936	0,0029	0,9584
NaCl*NaCl	1	1	487,419	1,5232	0,2570
Met*pH	1	1	6,812	0,0213	0,8881
NaCl*pH	1	1	7,784	0,0243	0,8805
pH*pH	1	1	674,368	2,1074	0,1899

*Significativo

Tabla 50. Actividad de respuesta de HuPH20 medida después de almacenarla a 35 °C durante 5 días

Resumen del ajuste				
Rcuadrado	0,970969			
Ajuste de Rcuadrado	0,933643			
Error cuadrático medio	17,2642			
Media de respuesta	403,3303			
Observaciones (o sumas ponderadas)	17			
Análisis de la varianza				
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Relación F
Modelo	9	69779,522	7753,28	26,0131
Error	7	2086,367	298,05	Prob. > F

C. Total	16		71865,889		0,0001*
Pruebas de efecto					
Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	Relación F	Prob. > F
Met	1	1	1,347	0,0045	0,9483
NaCl	1	1	40555,093	136,0670	< 0,0001*
pH	1	1	25833,100	86,6730	< 0,0001*
Met*Met	1	1	1473,541	4,9439	0,0616
Met*NaCl	1	1	146,858	0,4927	0,5054
NaCl*NaCl	1	1	84,069	0,2821	0,6118
Met*pH	1	1	14,175	0,0476	0,8336
NaCl*pH	1	1	1176,764	3,9482	0,0873
pH*pH	1	1	345,281	1,1585	0,3175
*Significativo					

C. Exploración de estabilizantes potenciales para las formulaciones de rHuPH20/insulina

- 5 Se exploraron diversos compuestos respecto de su capacidad para actuar como estabilizantes de proteínas en las formulaciones de rHuPH20/insulina. Los excipientes incluyeron aminoácidos y sus derivados, aminos, polioles, sales y tampones y otros compuestos (véase la tabla 51 a continuación). Cada compuesto se exploró, típicamente a dos concentraciones, respecto de su efecto en la actividad enzimática de rHuPH20 y la solubilidad de la insulina. La formulación básica contenía típicamente 100 U/ml de insulina/análogo de insulina, 5 µg/ml de rHuPH20, Tris/HCl 20 mM, m-cresol al 0,15 % y fenol al 0,2 % a un pH de 7,3 ± 0,1. Las formulaciones que contenían 100-140 mM de NaCl se usaron como formulaciones de referencia y los estabilizantes potenciales reemplazaron la totalidad o parte del NaCl en las formulaciones. La actividad enzimática se midió tal como se describe en el ejemplo 2 anterior en muestras incubadas a 30 °C durante aproximadamente una semana. La solubilidad de la insulina se evaluó mediante RP-HPLC (véase el ejemplo 3 anterior) en muestras almacenadas a 5 °C.
- 10
- 15 Los resultados se exponen en la tabla 51 a continuación. La evaluación fue semicuantitativa en comparación con NaCl. Una mayoría de los compuestos ensayados no tuvieron efecto en la solubilidad de insulina, provocando los restantes una disminución en la solubilidad de la insulina. Los datos anteriores (véanse los ejemplos 8-9) indicaron que el pH y la sal, dos condiciones que pueden influenciar potencialmente a la carga de la proteína en solución, influyen la solubilidad de la insulina. En la presente exploración, las moléculas o compuestos que contenían cationes divalentes (Mg²⁺ (cloruro de magnesio) y SO₄²⁻ (sulfato sódico) y Lys-Lys) provocaron una gran precipitación de la insulina. Parece que un mecanismo de repulsión de carga podría ser importante para prevenir que las moléculas de insulina interactúen entre sí. Lys-Lys, el cloruro de magnesio y los oligómeros de ácido hialurónico (HA, 4-16 meros) se identificaron como moléculas que estabilizaron a rHuPH20 más que el NaCl. Debido al hecho de que tanto Lys-Lys como cloruro de magnesio redujeron la solubilidad de la insulina, estas moléculas no se consideraron estabilizantes viables a altas concentraciones. La reducción de la concentración de Lys-Lys reducirá su impacto en la solubilidad de la insulina.
- 20
- 25

Tabla 51. Resumen de la exploración del estabilizante de rHuPH20/insulina

Categoría	Nombre del compuesto	Efecto en la actividad enzimática de rHuPH20	Efecto en la solubilidad de la insulina
Aminoácido, derivado y aminos	L-Arginina	Similar a NaCl	Solubilidad reducida significativamente; provoca una fuerte precipitación
	Glutamina	Sin efecto	Sin efecto
	Glicina	Sin efecto	Sin efecto
	Lisina	Sin efecto	Sin efecto
	Metionina	Sin efecto	Sin efecto
	Prolina	Sin efecto	Sin efecto
	Lys-Lys	Fuerte estabilizante	Solubilidad reducida
	Gly-Gly	Sin efecto	Sin efecto
	Oxido de trimetilamina (TMAO)	Sin efecto	Sin efecto
Betaína	Sin efecto	Sin efecto	
Polioles	glicerol	Sin efecto	Efecto nulo/leve; puede diferir ligeramente la formación de cristal

Tabla 51. Resumen de la exploración del estabilizante de rHuPH20/insulina			
Categoría	Nombre del compuesto	Efecto en la actividad enzimática de rHuPH20	Efecto en la solubilidad de la insulina
	sorbitol	Sin efecto	Efecto nulo/leve; puede diferir ligeramente la formación de cristal
	Manitol	Sin efecto	Efecto nulo/leve; puede diferir ligeramente la formación de cristal
	Inositol	Sin efecto	Sin efecto
	Sacarosa	Sin efecto	Efecto nulo/leve; puede diferir ligeramente la formación de cristal
	Trehalosa	Sin efecto	Efecto nulo/leve; puede diferir ligeramente la formación de cristal
Sales y tampones	Cloruro de magnesio	Estabilizante eficaz	Precipitación
	Sulfato de sodio	Sin efecto	Precipitación aumentada en comparación con NaCl
	Tris (100 mM)	Sin efecto	Sin efecto
	Benzoato de sodio	Sin efecto	Precipitación reducida en comparación con NaCl
Otros	Oligómeros de ácido hialurónico (HA) (4-16meros)	Estabilizante eficaz	Sin efecto
	Albúmina de suero humana	Sin efecto	Sin efecto
	Ácido fenil butírico	Sin efecto	Sin efecto
	Taurocolato	Sin efecto - puede ser desestabilizante	Sin efecto
	PVP	No evidente	Sin efecto

D. Efecto de oligómeros de HA en las formulaciones de rHuPH20/insulina

- 5 Los oligómeros de HA se examinaron adicionalmente respecto de su capacidad para estabilizar las formulaciones de rHuPH20/insulina. Los oligómeros de HA son el sustrato/producto de la reacción enzimática de rHuPH20 con el hialuronano, y como tal podría unirse posiblemente al sitio enzimático activo, provocando de este modo el efecto estabilizante. Se llevó a cabo un estudio de diseño de experimento (DOE) para investigar los efectos del pH, la concentración de NaCl y la concentración de oligómero de HA en la estabilidad general de rHuPH20/insulina.
- 10 La formulación básica contenía 3,75 mg/ml de insulina (Insulina Organon API, insulina humana recombinante SIHR 143, la solución se preparó tal como se describe en el ejemplo 1), 5 µg/ml de rHuPH20, Tris/HCl 15 mM, ZnCl₂ al 0,01 %, Poloxamer 188 al 0,01 %, 0,15 % de fenol y 0,15 % de m-cresol. Se evaluó un total de 17 muestras, con tres niveles de pH diferentes (7,1, 7,3 y 7,5), tres concentraciones de NaCl (50, 75 y 100 mM) y tres concentraciones de oligómero de HA (1, 5,5 y 10 mg/ml). La actividad enzimática de rHuPH20 se midió en muestras incubadas a 30 °C
- 15 durante 1 semana o en muestras almacenadas a 2-8 °C durante 9 meses. La oxidación de rHuPH20 se midió mediante RP-HPLC en muestras almacenadas a 5 °C durante 9 meses. El contenido de insulina se midió mediante RP-HPLC para muestras almacenadas a 2-8 °C durante 9 meses.
- 20 Las formulaciones y los resultados se exponen en la tabla 52 a continuación. El contenido de insulina se expresa como % de recuperación respecto de un patrón de referencia USP. El porcentaje (%) del área de pico de oxidación de rHuPH20 es la suma de los picos ox-1 (principal) y ox-2 (secundario). Los análisis estadísticos se exponen en la tabla 53 a continuación. Tal como se muestra en la tabla 53, la concentración de HA y NaCl tuvieron ambas un efecto significativo en la actividad enzimática de rHuPH20 cuando se midió después de incubación a 30 °C durante 1 semana. A medida que aumentaron las concentraciones de NaCl y HA, también aumentó la actividad enzimática de
- 25 rHuPH20. Esto fue particularmente cierto cuando ambas concentraciones de excipiente fueron mayores, lo que indica una interacción significativa entre los dos factores (véase la tabla 53, P = 0,0150).

Tabla 52. Efecto de HA, pH y NaCl en la actividad de rHuPH20 y la solubilidad de la insulina							
Ejecución n.º	pH	HA, mg/ml	NaCl, mM	Actividad enzimática (U/ml) 30 °C, 1 semana	Contenido de insulina	% de área de pico de oxidación de rHuPH20	Actividad enzimática (U/ml) 2-8 °C, 9 meses
1	7,5	1	75	254	92,08	27,09	574
2	7,1	1	75	341	52,38	26,43	576

Tabla 52. Efecto de HA, pH y NaCl en la actividad de rHuPH20 y la solubilidad de la insulina

Ejecución n.º	pH	HA, mg/ml	NaCl, mM	Actividad enzimática (U/ml) 30 °C, 1 semana	Contenido de insulina	% de área de pico de oxidación de rHuPH20	Actividad enzimática (U/ml) 2-8 °C, 9 meses
3	7,3	10	50	267	91,58	75,03	515
4	7,3	1	50	173	92,08	29,00	562
5	7,3	1	100	136	45,33	30,64	531
6	7,1	5,5	100	407	21,99	55,72	521
7	7,3	5,5	75	273	89,07	58,19	523
8	7,3	5,5	75	296	85,73	55,63	506
9	7,3	5,5	75	257	87,99	58,29	504
10	7,1	5,5	50	363	82,41	55,54	524
11	7,5	10	75	389	91,16	70,57	495
12	7,3	5,5	75	357	87,63	58,61	505
13	7,3	10	100	537	43,57	72,43	521
14	7,1	10	75	510	38,06	72,09	494
15	7,3	5,5	75	391	86,17	56,13	510
16	7,5	5,5	50	313	91,68	52,36	489
17	7,5	5,5	100	424	89,91	53,63	478

Tabla 53. Análisis estadísticos del estudio DOE en el efecto de HA, pH, y NaCl en la actividad enzimática de rHuPH20 a 30 °C durante 1 semana

Resumen del ajuste					
Rcuadrado	0,869567				
Ajuste de Rcuadrado	0,768119				
Error cuadrático medio	51,19549				
Media de respuesta	334,5882				
Observaciones (o sumas ponderadas)	17				
Análisis de la varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Relación F	
Modelo	7	157261,32	22465,9	8,5716	
Error	9	23588,80	2621,0	Prob. > F	
C. Total	16	180850,12		0,0023*	
Pruebas de efecto					
Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	Relación F	Prob. > F
pH	1	1	7260,125	2,7700	0,1304
HA	1	1	79800,125	30,4467	0,0004*
NaCl	1	1	18818,000	7,1798	0,0252*
pH*pH	1	1	26012,463	9,9247	0,0117*
HA*HA	1	1	1667,411	0,6362	0,4456
HA*NaCl	1	1	23562,250	8,9899	0,0150*
NaCl*NaCl	1	1	1167,253	0,4454	0,5213

*Significativo

- Se destacó que en la mayoría de todos los estudios anteriores que evalúan las formulaciones de insulina/rHuPH20 en ausencia de HA, el aumento de pH tuvo un efecto significativo y negativo en la actividad enzimática de rHuPH20, especialmente en el intervalo de pH de 6,0 a 8,0. Por el contrario, en este estudio en el que se incluyó HA en las formulaciones, el pH pareció tener poco o ningún efecto en la actividad enzimática de rHuPH20. Por lo tanto, parece que la presencia de HA en la formulación de insulina/rHuPH20 reduce o niega el efecto negativo que puede tener un pH mayor en la actividad enzimática de rHuPH20.
- 10 Para evaluar adicionalmente la utilidad del HA como estabilizante, el contenido de insulina se evaluó mediante RP-HPLC en las muestras que se habían almacenado a 2-8 °C durante 9 meses. Los datos de contenido de insulina y los resultados del análisis estadístico se muestran en las tablas 54 y 55 a continuación. Los resultados demuestran claramente la significación del pH y la concentración de NaCl en la solubilidad de la insulina ($p < 0,0001$ para ambos factores). A medida que aumentó el pH, aumentó la solubilidad de la insulina. A medida que aumentó la
- 15 concentración de NaCl, se redujo la solubilidad de la insulina. El efecto del HA en la solubilidad/contenido de insulina no fue significativo ($p = 0,2755$). Por lo tanto, los oligómeros de HA pueden ser un excipiente/estabilizante para las formulaciones de rHuPH20/insulina o de rHuPH20/análogo de insulina.

El almacenamiento a largo plazo de las formulaciones que contenían oligómeros de HA mostró un aumento significativo en el nivel de oxidación de rHuPH20 en comparación con las formulaciones que no incluían HA añadido. El nivel de oxidación parecía estar bien correlacionado con la concentración de HA, pero fue independiente del pH o de la concentración de NaCl (véanse las tablas 55 y 56 a continuación). El HA contiene ácido glucurónico, que puede ser un donante de oxígeno potencial por lo que podría necesitarse un antioxidante o secuestrante de oxígeno si el HA es un excipiente en las formulaciones finales de rHuPH20-insulina. En este estudio, algunas de las formulaciones se oxidaron fuertemente, aunque la actividad enzimática permaneció razonablemente intacta (véase la tabla 55), lo que confirmó que la rHuPH20 oxidada todavía mantiene una actividad enzimática significativa. Los análisis estadísticos multivariantes indicaron que las actividades enzimáticas de rHuPH20 de estas muestras de almacenamiento a baja temperatura a largo plazo se vieron afectadas significativamente por el HA ($p = 0,004$, actividad enzimática reducida), pero no por el pH o el NaCl ($p = 0,1715$ y $0,4766$, respectivamente) (véase la tabla 56 a continuación).

Tabla 54. Efecto de HA, pH, y NaCl en el contenido de insulina para las muestras almacenadas a 2-8 °C durante 9 meses				
Resumen del ajuste				
Rcuadrado	0,978698			
Ajuste de Rcuadrado	0,951309			
Error cuadrático medio	5,231467			
Media de respuesta	74,63647			
Observaciones (o sumas ponderadas)	17			
Análisis de la varianza				
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Relación F
Modelo	9	8801,6746	977,964	35,7335
Error	7	191,5778	27,368	Prob. > F
C. Total	16	8993,2524		< 0,0001*
Estimaciones de parámetro				
Plazo	Estimación	Error estándar	Relación de t	Prob. > t
Punto de corte	-626,7315	67,81624	-9,24	< 0,0001*
pH	106,24375	9,248015	11,49	< 0,0001*
HA	-0,486111	0,411023	-1,18	0,2755
NaCl	-0,78475	0,073984	-10,61	< 0,0001*
(pH-7,3)*(pH-7,3)	-194,2562	63,73755	-3,05	0,0186*
(pH-7,3)*(HA-5,5)	3,7222222	2,906371	1,28	0,2411
(HA-5,5)*(HA-5,5)	-0,549519	0,125901	-4,36	0,0033*
(pH-7,3)*(NaCl-75)	2,9325	0,523147	5,61	0,0008*
(HA-5,5)*(NaCl-75)	-0,0028	0,023251	-0,12	0,9075
(NaCl-75)*(NaCl-75)	-0,01288	0,004079	-3,16	0,0160*

*Significativo

Tabla 55. Efecto de HA, pH y NaCl en la oxidación de rHuPH20 almacenado a 2-8 °C durante 9 meses				
Resumen del ajuste				
Rcuadrado	0,997321			
Ajuste de Rcuadrado	0,993876			
Error cuadrático medio	1,253363			
Media de respuesta	53,37529			
Observaciones (o sumas ponderadas)	17			
Análisis de la varianza				
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Relación F
Modelo	9	4093,6132	454,846	289,5415
Error	7	10,9964	1,571	Prob. > F
C. Total	16	4104,6096		< 0,0001*
Estimaciones de parámetro				
Plazo	Estimación	Error estándar	Relación de t	Prob. > t
Punto de corte	58,118819	16,24751	3,58	0,0090*
pH	-3,83125	2,215653	-1,73	0,1274
HA	4,9155556	0,098473	49,92	< 0,0001
NaCl	0,00245	0,017725	0,14	0,8940
(pH-7,3)*(pH-7,3)	-72,34375	15,27033	-4,74	0,0021*

(pH-7,3)*(HA-5,5)	-0,605556	0,696313	-0,87	0,4133
(HA-5,5)*(HA-5,5)	-0,26821	0,030164	-8,89	< 0,0001
(pH-7,3)*(NaCl-75)	0,0545	0,125336	0,43	0,6768
(HA-5,5)*(NaCl-75)	-0,009422	0,005571	-1,69	0,1346
(NaCl-75)*(NaCl-75)	-0,000262	0,000977	-0,27	0,7964

*Significativo

Tabla 56. Efecto de HA, pH y NaCl en la actividad enzimática de rHuPH20 almacenado a 2-8 °C durante 9 meses

Resumen del ajuste				
Rcuadrado	0,8159			
Ajuste de Rcuadrado	0,5792			
Error cuadrático medio	18,33595			
Media de respuesta	519,2941			
Observaciones (o sumas ponderadas)	17			
Análisis de la varianza				
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Relación F
Modelo	9	10430,079	1158,90	3,4470
Error	7	2353,450	336,21	Prob. > F
C. Total	16	12783,529		0,0584
Estimaciones de parámetro				
Plazo	Estimación	Error estándar	Relación de t	Prob. > t
Punto de corte	917,96806	237,6915	3,86	0,0062*
pH	-49,375	32,41369	-1,52	0,1715
HA	-6,055556	1,440608	-4,20	0,0040*
NaCl	-0,195	0,25931	-0,75	0,4766
(pH-7,3)*(pH-7,3)	-51,25	223,3959	-0,23	0,8251
(pH-7,3)*(HA-5,5)	0,8333333	10,18664	0,08	0,9371
(HA-5,5)*(HA-5,5)	1,3432099	0,441276	3,04	0,0187*
(pH-7,3)*(NaCl-75)	-0,4	1,833595	-0,22	0,8335
(HA-5,5)*(NaCl-75)	0,0822222	0,081493	1,01	0,3466
(NaCl-75)*(NaCl-75)	-0,00728	0,014297	-0,51	0,6263

*Significativo

Ejemplo 11

5 Efecto de la concentración de sal, pH y concentración de tampón en rHuPH20 en presencia de metilparabeno

En este ejemplo, se usó un diseño experimental Box-Behnken para determinar el pH óptimo, la concentración de sal (NaCl) y la concentración de tampón (Hepes) para la estabilidad de rHuPH20 a temperaturas elevadas en presencia del conservante fenólico, metilparabeno. En este experimento de método de superficie de respuesta (RSM) de diseño de experimento (DOE), tres factores, a saber, diversas concentraciones de tampón y sal, y pH, se examinaron respecto de sus efectos en la actividad de rHuPH20 en condiciones aceleradas, mientras que las muestras se sometieron a estreses, incluyendo elevada temperatura y agitación. Las respuestas medidas incluyeron la actividad enzimática y la pureza/contenido, medida mediante HPLC de fase inversa.

- 15 El estudio se basó en el paquete informático de DOE Design-Expert® 7.1. (StatEase, Minneapolis, MN). Los intervalos y puntos medios de la concentración de Hepes, la concentración de NaCl y pH usados en el experimento se listan en la tabla 57 a continuación. Para llevar a cabo el estudio, se prepararon un total de 13 formulaciones diferentes con 5 puntos centrales repetidos, basándose en una secuencia aleatoria que generó el programa informático. Cada muestra contenía 100 µg/ml de rHuPH20 (a partir de una solución de 10 mg/ml en histidina/HCl, pH 6,5, NaCl 130 mM), metilparabeno al 0,20 % (Fluka, n.º de cat. 85265) y propilparabeno al 0,025 % (American Custom Chemicals, San Diego, n.º de cat. CHEM-19713), con diversas concentraciones de Hepes (Calbiochem, n.º de cat. 391338) y NaCl (EMD, SX0418-1) y se ajustó el pH tal como se especifica en la tabla 58 a continuación usando NaOH o HCl 1,0 N. Las soluciones se repartieron en alícuotas en viales de vidrio de tipo 1 de 2 ml (Wheaton, n.º de cat. 223683) con tapones de goma (Wheaton, n.º de cat. 224100-072) y se selló con tapones de aluminio, con 2 viales por formulación. Las muestras se colocaron en un incubador con la temperatura ajustada a 35 °C. Un conjunto de viales se sometió a agitación usando un agitador Titer Plate (LabLine) a 600 rpm durante 3 días (35 + ag). El otro conjunto de viales se mantuvo a 35 °C durante 5 días sin agitación. Las muestras se sometieron a ensayo después del periodo de incubación.

Factor	Punto medio	Intervalos
Concentración de Hepes	11 mM	2-20 mM
Concentración de NaCl	150 mM	120-180 mM
pH	7	6-8

Tabla 58. Diseño de RSM de Box-Behnken, incluyendo respuestas

STD	Ejecución n.º	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Respuesta 1	Respuesta 2	Respuesta 3	Respuesta 4
		NaCl mM	Hepes mM	pH	Enz (35 + ag)	SEC (35 + ag)*	Enz (35)	SEC (35)*
5	1	120	11	6	2119	38,91	7.474	95,54
15	2	150	11	7	6944	78,50	8.260	95,82
10	3	150	20	6	5744	70,96	8.784	94,94
1	4	120	2	7	5228	63,06	6.958	84,71
16	5	150	11	7	7023	80,69	8.022	93,95
7	6	120	11	8	2138	34,15	2.829	62,12
6	7	180	11	6	5864	70,36	8.704	93,53
8	8	180	11	8	5297	63,89	6.052	59,80
12	9	150	20	8	4554	55,72	5.378	74,59
13	10	150	11	7	5709	74,53	8.184	91,14
11	11	150	2	8	4031	42,09	4.392	61,61
4	12	180	20	7	6192	69,69	8.708	94,85
9	13	150	2	6	8178	81,28	9.642	91,32
17	14	150	11	7	7464	80,22	8.651	93,58
3	15	120	20	7	7101	71,51	8.681	89,31
2	16	180	2	7	7194	77,18	8.755	93,34
14	17	150	11	7	6482	74,79	8.721	93,51

*: Porcentaje de pico principal de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en comparación con una referencia.

5 La actividad enzimática se midió tal como se describe en el ejemplo 2b anterior. Se usó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para evaluar la pureza midiendo el porcentaje del pico principal en comparación con una muestra de referencia (véase el ejemplo 4 anterior). La SEC se llevó a cabo usando las siguientes condiciones: Suero salino tamponado con fosfato (PBS) 1X, una columna Toso BioScience G2000 SWXL, y un caudal ajustado a 1 ml/min. Los datos se recogieron tal como se describe anteriormente y se comunicaron las medias y se introdujeron en la tabla de diseño después de la secuencia de muestra proporcionada por el programa de DOE. Los resultados se muestran en la tabla 58 anterior.

15 Para el análisis de los datos, los datos en bruto se analizaron del modo siguiente. En resumen, los datos se ajustaron a un modelo cuadrático como punto de partida. La ANOVA se llevó a cabo basándose en el modelo cuadrático, pero típicamente se necesitó reducir los parámetros para hacer que el modelo cumpliera más estrechamente con todos los criterios siguientes: nivel significativo del modelo $P < 0,05$, valor de p para ausencia de ajuste ($P > 0,1$), nivel de precisión adecuado > 4 , y R-cuadrado predicha dentro de 0,2 de la R-cuadrado ajustada. Finalmente, se comprobaron los análisis residuales y las gráficas diagnósticas para asegurar que se cumplían las suposiciones de la ANOVA. En algunos casos, se necesitó transformar los datos para cumplir esos criterios; en esos casos, los datos en bruto se transformaron mediante una ecuación matemática adecuada seguido después del análisis estadístico tal como se describió anteriormente. Los modelos de prueba ANOVA para el modelo usado para cada respuesta se exponen en la tabla 59 a continuación, que indica la respuesta, la ecuación del modelo, de si se usó una transformación y el tipo de transformación, el valor de P del modelo y el valor de P de ausencia de ajuste.

Tabla 59. Prueba ANOVA para cada modelo

	Modelo*	Transformación	Valor de P del modelo	Valor de P de ausencia de ajuste
Respuesta 1, actividad enzimática (35 °C - AG)	$Y=A+C+A2+C2$	Ninguno	Significativo $P=0,009$	No significativo $P=0,091$
Respuesta 2, pico principal de SEC (35 °C - AG)	$Y=A+C+A2+C2$	Logit	Significativo $P=0,0007$	No significativo $P=0,109$
Respuesta 3, actividad enzimática (35 °C - 5D)	$Y=A+B+C+AB+BC+AC+A2+B2+ C2$	Ninguno	Significativo $P=0,0002$	No significativo $P=0,076$
Respuesta 4, pico principal de SEC (35 °C - 5D)	$Y=A+B+C+A2+ C2$	Logit	Significativo $P<0,0001$	No significativo $P=0,147$

*A - NaCl; B - Tampón Hepes; C - pH

A. Efecto del pH, NaCl y concentraciones de tampón en rHuPH20 a temperatura acelerada con agitación

Los modelos de ANOVA demuestran, que con agitación excesiva a 35 °C, la concentración de tampón no tiene efecto en la actividad enzimática y en el contenido/pureza de rHuPH20 (véase la tabla 59 anterior, Respuesta 1 y 2, en donde la ecuación del modelo no incluye tampón). Se predijo que rHuPH20 era más estable entre pH 6,5-7,3 con una concentración de NaCl entre 145-180 mM. Fuera de estos intervalos, el modelo predijo que la actividad de rHuPH20 podría reducirse, en particular, cuando el pH es de 8,0 y cuando la concentración de sal se encuentra a la concentración más baja (120 mM). En estas condiciones aceleradas, la mayor actividad de rHuPH20 medida fue de aproximadamente 8100 U/ml (STD 9 en la tabla 56 anterior), lo que es aproximadamente un 65 % de la actividad de rHuPH20 esperada (aproximadamente 12.000 U/ml) basándose en 100 µg/ml de enzima. Se observaron resultados similares para la pureza/contenido de rHuPH20 determinada mediante SEC, siendo la pérdida del contenido del pico principal para la formulación más estable aproximadamente un 20 % de la esperada.

Los intervalos óptimos para la concentración de sal y el pH para la actividad enzimática de rHuPH20 fueron ligeramente más estrechos que aquellos para el contenido/pureza de rHuPH20. Por lo tanto, la actividad enzimática de rHuPH20 es más sensible a las condiciones de estrés, indicando de este modo que la actividad enzimática de rHuPH20 es un método mejor para indicar estabilidad.

B. Efectos del pH, concentraciones de NaCl y tampón en rHuPH20 a temperatura acelerada sin agitación

Los datos muestran que en condiciones menos estresantes (es decir, sin agitación), se observaron disminuciones menores en la actividad enzimática y menor pérdida de pico principal. Por ejemplo, para las mejores muestras, solo se observó una pérdida de actividad del 20 % (en comparación con el 35 % para muestras incubadas con agitación) y se observó una pérdida del pico principal menor del 5 % en comparación con el 20 % para muestras incubadas con agitación). Además, los modelos ANOVA demuestran que la concentración de sal no tiene un efecto significativo en la actividad enzimática. rHuPH20 sigue siendo enzimáticamente activa a un pH menor de 6,5, en tanto que la concentración de sal sea de al menos 130 mM. Además, la actividad enzimática óptima se observa con un pH menor de 7.

Ejemplo 12**Estudio de estabilidad de insulina Lispro/rHuPH20 o insulina Aspart/rHuPH20 con conservantes****Tablas de datos provisionales a los seis meses**

En este ejemplo, la estabilidad de diversas formulaciones de insulina Lispro/rHuPH20 se evaluó en tres condiciones de almacenamiento: 5 °C, 25 °C y 30 °C a lo largo del tiempo. También se evaluó una formulación en dos condiciones físicas de estrés acelerado: múltiples ciclos de congelación/descongelación y agitación a 25 °C. Las formulaciones variaron en cuanto a pH y niveles de conservante. La estabilidad se evaluó midiendo la apariencia y características generales, la actividad enzimática de rHuPH20 y la pureza de rHuPH20 y del análogo de insulina.

Las formulaciones de insulina Lispro/rHuPH20 se exponen en la tabla 60 a continuación.

Tabla 60. Formulaciones de insulina Lispro/rHuPH20 o formulaciones de insulina Aspart/rHuPH20									
n.º	pH	Tampón	Modificador de la tonicidad		Tensioactivo	Conservantes		API	
1	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro o Aspart
2	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro o Aspart
3	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro o Aspart
4	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,10 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro o Aspart
5	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	Poloxamer al 0,01 % 188	Fenol al 0,10 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro o Aspart
6	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,10 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro o Aspart

7	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,14 %	m-cresol al 0,085 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro o Aspart
8	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,14 %	m-cresol al 0,085 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro o Aspart

Se almacenó un (1) ml de cada formulación en viales de vidrio de 2 ml de borosilicato de tipo 1 USP con un tapón de goma de clorobutilo y un sello de aluminio. Cada formulación se incubó, individualmente, a 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C y 30 ± 3 °C y las mediciones de estabilidad se registraron a los 0, 0,5, 1, 2, 3 y 6 meses. La formulación n.º 2 se sometió a agitación (agitación a 650 rpm) a 25 °C durante 24 horas. La formulación n.º 2 se sometió a 5 ciclos de congelación/descongelación alternando las condiciones de almacenamiento entre un congelador a -30 °C y temperatura ambiente en banco de trabajo. La muestra se dejó en cada condición durante al menos 2 horas para cada ciclo (es decir 2 horas en un congelador a -30 °C, retirando y colocando sobre el banco de trabajo a temperatura ambiente durante 2 horas, lo que se considera 1 ciclo).

La estabilidad se evaluó midiendo el pH, la apariencia, incluyendo la osmolalidad, la turbidez a 350 nm y la observación cualitativa, la actividad enzimática de rHuPH20, el porcentaje de pureza y el porcentaje de recuperación de rHuPH20 mediante RP-HPLC, el porcentaje de pureza y el porcentaje de recuperación de insulina Lispro mediante RP-HPLC, y el porcentaje de pureza de insulina Lispro mediante SEC no desnaturizante y desnaturizante (véanse los ejemplos 2-5). Para la osmolalidad, el criterio de aceptación de estabilidad fue de 275 ± 30 mOsm/kg. Para la apariencia, el criterio de aceptación de estabilidad fue que fuese una solución transparente, incolora. Para la actividad de rHuPH20, el criterio de aceptación de estabilidad fue que la formulación mostrase > 375 U/ml (basado en > 75 U/ μ g). Para el porcentaje de recuperación de rHuPH20 mediante RP-HPLC, la especificación diana aceptable fue 3-7 μ g/ml (60-140 %) mediante RP-HPLC. Para la pureza de la insulina mediante RP-HPLC, la especificación diana aceptable fue ≥ 90 % de pureza mediante RP-HPLC. Para la recuperación de insulina mediante RP-HPLC, la especificación diana aceptable fue 90-100 U/ml (90-110 %) mediante RP-HPLC. Para el porcentaje de pureza mediante SEC no desnaturizante, la especificación diana aceptable fue ≤ 2 % de especies de insulina de alto peso molecular (HMWt) mediante área del pico. Para la pureza de la insulina mediante SEC desnaturizante, la especificación diana aceptable fue ≤ 2 % de especies de insulina de alto peso molecular (HMWt) mediante área del pico con SEC desnaturizante.

Los resultados se resumen a continuación. Se determinó que las formulaciones de insulina Lispro/rHuPH20 expuestas en la tabla 60, formulaciones n.º 1, n.º 2 y n.º 3 con bajo contenido de insulina lispro a T = 0 (91,22 %, 91,40 % o 91,30 %, respectivamente), mientras que las otras formulaciones contenían aproximadamente un 100 % de contenido de proteína.

1. Instante de 3 meses

a. Insulina Lispro

Todas las formulaciones ensayadas fueron estables a 5 ± 3 °C hasta el instante de 3 meses tanto para rHuPH20 como para insulina Lispro. Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. El contenido de insulina Lispro fue bajo (aproximadamente un 91 % de recuperación del objetivo) para las formulaciones n.º 1-n.º 3, pero esto parece ser un error de preparación de la formulación, ya que el porcentaje de recuperación fue constante, tal como se esperaba, a 5 °C.

A 25 ± 2 °C, rHuPH20 en todas las formulaciones fue estable, con la excepción de la formulación n.º 8 que se encontró por debajo de la especificación diana de 375 U/ml para la actividad enzimática de rHuPH20 entre 2 y 3 meses. Esto no fue inesperado, ya que la formulación n.º 8 tenía un alto pH y una alta concentración de conservante y en general, rHuPH20 es más estable a menor pH y menor concentración de conservante. La insulina Lispro fue generalmente estable en todas las formulaciones a 25 °C hasta el instante de los 3 meses, pero la pureza comenzó a reducirse levemente según se evaluó mediante RP-HPLC tras aproximadamente 1 mes.

A 30 ± 3 °C solo las formulaciones de menor pH (n.º 1 y n.º 4, ambas a pH 7,2) se encontraron por encima de la especificación diana para la actividad enzimática de rHuPH20 (> 375 U/ml) tras 1 mes a 30 °C. La formulación n.º 2 se encontró por encima de la especificación diana tras 2 semanas a 30 °C pero se encontró por debajo de 375 U/ml tras un mes. La insulina Lispro fue generalmente estable dentro de la especificación diana durante 3 meses en todas las formulaciones a 30 °C, pero hubo una disminución en la pureza ligeramente menor de la que se observó a 25 °C. La disminución en la pureza se vio acompañada por una disminución en el contenido a 30 °C que no fue evidente a 25 °C. Tras el instante de 3 meses, se terminó con las condiciones a 30 °C.

b. Insulina Aspart

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Todas las formulaciones ensayadas fueron estables a 5 ± 3 °C hasta el instante de 3 meses tanto para rHuPH20 como para insulina Aspart.

5 rHuPH20 cumplió las especificaciones diana para todas las formulaciones mantenidas a 25 ± 2 °C hasta los 3 meses con la excepción de la formulación n.º 7 que se encontraron por debajo de la especificación diana de 375 U/ml para la actividad de rHuPH20 entre 2 y 3 meses. Esto es ligeramente inesperado, ya que las formulaciones n.º 7 y n.º 8 son idénticas, salvo para los valores de pH (7,2 y 7,6, respectivamente), y en general, rHuPH20 ha sido más estable a un pH menor. Este resultado inesperado se debe probablemente al hecho de que la formulación n.º 7 comenzó a
10 una actividad menor (500 U/ml) y contenido (93,8 %) que los diana (600 U/ml y 100 %, respectivamente), y está apoyado además por los valores de pureza aceptables para las formulaciones n.º 7 y n.º 8. La insulina Aspart fue estable en todas las formulaciones a 25 °C hasta el instante de 3 meses pero hay una tendencia ligeramente decreciente en la pureza y % de recuperación. rHuPH20 fue menos estable en todas las formulaciones mantenidas a 30 ± 3 °C en comparación con aquellas a 25 °C. Las formulaciones de menor pH (n.º 1 y n.º 4, ambas a pH 7,2) y las
15 formulaciones con menor conservante total (n.º 4 y n.º 5, nivel total de conservante = 0,175 %) se encontraron aún por encima de la especificación diana para la actividad enzimática de rHuPH20 tras 1 mes a 30 °C. La formulación n.º 2 se encontró justo por debajo de la especificación diana tras 1 mes a 30 °C y la formulación n.º 6 se encontró ligeramente por encima de la especificación diana para la actividad tras 1 mes pero ligeramente por debajo tras 2 semanas. Las formulaciones n.º 1-n.º 6 permanecieron generalmente dentro de la especificación diana para la
20 actividad enzimática de rHuPH20 tras 2 semanas a 30 °C. La insulina Aspart permaneció estable dentro de la especificación diana durante 3 meses en todas las formulaciones a 30 °C pero hubo una tendencia negativa ligeramente mayor en la pureza y % de recuperación que la observada a 25 °C. La porción de 30 ± 3 °C del estudio se terminó tras el instante de 3 meses.

25 2. Instante de 6 meses

a. Insulina Lispro

30 Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Todas las formulaciones ensayadas fueron estables a 5 °C en el instante de 6 meses tanto para rHuPH20 como para insulina Lispro. El contenido de insulina Lispro fue bajo (recuperación de la diana de aproximadamente el 91 %) para las formulaciones n.º 1-n.º 3 tal como se había observado, pero el porcentaje de recuperación siguió siendo plano a 5 °C.

35 A 25 °C, rHuPH20 continuó siendo estable (> 375 U/ml de actividad de rHuPH20) para la formulación n.º 1, n.º 2, n.º 4, y n.º 5. Estas formulaciones se encontraron todas a un pH menor (7,2 o 7,4) con el nivel de conservante USP actual (n.º 1, n.º 2: fenol al 0,125 %, m-cresol al 0,075 %) o un nivel de conservante ligeramente menor (n.º 4, n.º 5: fenol al 0,1 %, m-cresol al 0,075 %). Todas las 8 formulaciones permanecieron dentro de la especificación de porcentaje de recuperación diana de rHuPH20 a los 6 meses pero hubo una reducción clara con respecto tanto a la
40 pureza de rHuPH20 y la recuperación mediante RP-HPLC. La reducción de la pureza mediante RP-HPLC, el contenido mediante RP-HPLC, y la pureza mediante SEC no desnaturalizante observada para la insulina Lispro anotada tras 3 meses a 25 °C fueron más evidentes a los 6 meses. La pureza mediante SEC desnaturalizante puede reducirse muy ligeramente pero todos los valores del pico principal fueron todavía $> 99,4$ % de tal forma que cualquier pérdida sea muy pequeña hasta este punto.

45 b. Insulina Aspart

50 Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Todas las formulaciones ensayadas fueron estables a 5 ± 3 °C en el instante de 6 meses tanto para rHuPH20 como para insulina Aspart.

rHuPH20 continuó cumpliendo las especificaciones de actividad diana para la actividad enzimática (> 375 U/ml) para 4 de las formulaciones mantenidas a 25 ± 2 °C (n.º 1, n.º 2, n.º 4, y n.º 5) hasta los 6 meses. Estas formulaciones se encontraron todas a un pH menor (7,2 o 7,4) con el nivel de conservante USP actual (n.º 1, n.º 2: fenol al 0,125 %,
55 m-cresol al 0,075 %) o un nivel de conservante ligeramente menor (n.º 4, n.º 5: fenol al 0,1 %, m-cresol al 0,075 %). Todas las 8 formulaciones permanecieron dentro de la especificación de porcentaje de recuperación diana de rHuPH20 a los 6 meses pero se observó una reducción clara con respecto tanto a la pureza de rHuPH20 y la recuperación mediante RP-HPLC. Las tendencias negativas para insulina Aspart indicadas tras 3 meses a 25 °C fueron más evidentes a los 6 meses para la pureza mediante RP-HPLC, el contenido mediante RP-HPLC, y pureza
60 mediante SEC no desnaturalizante. La pureza mediante SEC desnaturalizante puede tener una tendencia ligeramente negativa pero todos los valores del pico principal fueron todavía $> 99,5$ % de tal forma que cualquier pérdida sea muy pequeña hasta este punto.

65 3. Condiciones aceleradas -Agitación a 25 °C y congelación/descongelación

a. Insulina Lispro

La formulación n.º 2 estaba nublada tras agitarla a 25 °C durante 24 horas. La insulina Lispro fue estable para ambas condiciones, aunque el porcentaje de recuperación se redujo a aproximadamente el 75 % después de 5 ciclos de congelación/descongelación. rHuPH20 cumplió las especificaciones de actividad diana (> 375 U/ml) para la muestra sometida a agitación a 25 °C durante 24 horas. Después de 5 ciclos de congelación/descongelación, rHuPH20 fue enzimáticamente inactivo.

b. Insulina Aspart

Se obtuvieron resultados similares para la formulación n.º 2 de insulina Aspart que la que se obtuvo para la formulación de insulina Lispro en condiciones de agitación o de congelación/descongelación.

Ejemplo 13

Estudio de estabilidad de insulina Lispro/rHuPH20, insulina Aspart/rHuPH20 o insulina Glulisina/rHuPH20 con diversos conservantes

Tablas de datos provisionales a los dos o tres meses

En este ejemplo, se evaluó la estabilidad de diversas formulaciones de insulina Lispro-rHuPH20, insulina Aspart-rHuPH20 o insulina Glulisina-rHuPH20 en cuatro condiciones de almacenamiento diferentes: 5 °C, 15 °C, 25 °C y 30 °C a lo largo del tiempo. Las formulaciones variaron en cuanto al pH, la concentración de sal y la concentración de glicerina. La estabilidad se evaluó midiendo la apariencia y características generales, la actividad enzimática de rHuPH20 y la pureza de rHuPH20 y del análogo de insulina. Este estudio estaba previsto para proporcionar datos de apoyo para desarrollo clínico de fase 3 a 3 niveles de conservante: los niveles de conservante contenido en preparaciones de insulina comerciales (Novolog) o los niveles de conservante de EP-B (Farmacopea Europea) y USP (Farmacopea de Estados Unidos).

Las formulaciones de insulina Lispro/rHuPH20 se exponen en la tabla 61 a continuación. Las formulaciones de insulina Aspart/rHuPH20 se exponen en la tabla 62. Las formulaciones de insulina Glulisina/rHuPH20 se exponen en la tabla 63. La formulación base contenía 3,5 mg/ml de insulina Lispro o Aspart, 600 U/ml de rHuPH20, Tris/HCl 30 mM, metionina 20 mM y Poloxamer 188 al 0,01 %. El pH, las concentraciones de NaCl y las concentraciones de glicerina se variaron dentro de tres concentraciones de conservante base.

Para las formulaciones de insulina Lispro/rHuPH20 y de insulina Aspart/rHuPH20 expuestas en las tablas 61 y 62, las formulaciones A1-A4 tienen el nivel de conservante de Novolog® comercial: 0,15 % de fenol y 0,172 % de m-cresol; las formulaciones B1-B5 tienen un nivel de conservante de EP-B: fenol al 0,1 % y m-cresol al 0,15 % y la formulación U1 tiene un nivel de conservante de USP: 0,125 % de fenol y 0,075 % de m-cresol.

Además, para las formulaciones de insulina Glulisina/rHuPH20 expuestas en la tabla 63, la formulación 1 tiene el nivel de conservante de Novolog® comercial: 0,15 % de fenol y 0,172 % de m-cresol. La formulación 2 tiene un nivel de conservante de EP-B: 0,1 % de fenol y 0,15 % de m-cresol. La formulación 3 tiene un nivel de conservante de USP: 0,125 % de fenol y 0,075 % de m-cresol. Las formulaciones 4-7 tienen el nivel de conservante de Novolog® comercial y se varían uno o más factores por comparación con la formulación 1. Las variaciones entre formulaciones se indican en fuente negrita. La formulación 4 tiene una mayor concentración de NaCl y la formulación 7 tiene un tensioactivo diferente. Las formulaciones 5 y 6 varían respecto de la formulación 4 en la concentración de metionina y el pH.

Tabla 61. Formulaciones de insulina Lispro/rHuPH20										
n.º	PH	Tampón	Modificador de la tonicidad			Tensioactivo	Conservantes		API	
A1	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 100 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	Tricresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro
A2	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	Tricresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro
A3	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	Tricresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro
A4	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 70 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	Tricresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro
B1	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 100 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro
B2	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro
B3	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro
B4	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 70 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro
B5	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 70 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro
U1	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	Tricresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Lispro

Tabla 62. Formulaciones de insulina Aspart/rHuPH20

n.º	PH	Tampón	Modificador de la tonicidad				Tensioactivo	Conservantes		API	
			NaCl	Metionina	Glicerina	Poloxamer		Fenol	Tricresol	rHuPH20	Aspart
A1	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 100 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	Tricresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart	
A2	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	Tricresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart	
A3	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	Tricresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart	
A4	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 70 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	Tricresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart	
B1	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 100 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart	
B2	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart	
B3	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart	
B4	7,6	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 70 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart	
B5	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 70 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart	
U1	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	Tricresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart	

Tabla 63. Formulaciones de insulina Glulisina/rHuPH20

n.º	pH	Tampón	Modificador de la tonicidad		Tensioactivo	Conservantes		API	
1	7,3	Tris/HCl 20 mM	NaCl 100 mM	Metionina 20 mM	Polisorbato 20 al 0,001 %	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Glulisina
2	7,3	Tris/HCl 20 mM	NaCl 100 mM	Metionina 20 mM	Polisorbato 20 al 0,001 %	Fenol al 0,10 %	m-cresol al 0,150 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Glulisina
3	7,3	Tris/HCl 20 mM	NaCl 100 mM	Metionina 20 mM	Polisorbato 20 al 0,001 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Glulisina
4	7,3	Tris/HCl 20 mM	NaCl 140 mM	Metionina 20 mM	Polisorbato 20 al 0,001 %	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Glulisina
5	7,3	Tris/HCl 20 mM	NaCl 140 mM	Metionina 0 mM	Polisorbato 20 al 0,001 %	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Glulisina
6	7,0	Tris/HCl 20 mM	NaCl 140 mM	Metionina 20 mM	Polisorbato 20 al 0,001 %	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Glulisina
7	7,3	Tris/HCl 20 mM	NaCl 100 mM	Metionina 20 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,172 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Glulisina

Se almacenó un (1) ml de cada formulación y se incubó a diversas temperaturas, tal como se describe en el ejemplo 12 anterior en viales de vidrio de 2 ml de borosilicato de tipo 1 USP con un tapón de goma de clorobutilo y un sello de aluminio. Las mediciones de estabilidad se registraron en diversos instantes: t = 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6 o 9 meses. La estabilidad también se evaluó midiendo el pH, la apariencia, la actividad enzimática de rHuPH20, el porcentaje de pureza y el porcentaje de recuperación de rHuPH20 mediante RP-HPLC, el porcentaje de pureza y el porcentaje de recuperación de insulina Lispro mediante RP-HPLC, y el porcentaje de pureza de insulina Lispro mediante SEC no desnaturalizante y desnaturalizante (véanse los ejemplos 2-5 y el ejemplo 12). Los criterios de aceptación o la especificación diana de estabilidad para cada parámetro ensayado son los mismos a los descritos en el ejemplo 12. Solo se evaluaron las muestras en un instante posterior si los resultados indicaron ≥ 30 % del nivel inicial.

Los resultados se resumen a continuación.

1. Instante de 1 mes

a. Insulina Lispro

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Todas las formulaciones ensayadas fueron estables a 5 ± 3 °C hasta el instante de 1 mes tanto para rHuPH20 como para insulina lispro. No se evaluaron las formulaciones a 15 ± 2 °C en el instante de un mes.

rHuPH20 fue estable en la mayoría de las formulaciones mantenidas a 25 ± 2 °C hasta 1 mes con la excepción de las formulaciones A1, A2, A4 y B4. Las formulaciones A1, A2, y B4 se encontraron por debajo de la especificación diana de 375 U/ml para la actividad enzimática de rHuPH20 entre 2 semanas y 1 mes y la formulación A4 se encontró por debajo del nivel de especificación diana 1 y 2 semanas después de su almacenamiento a 25 °C. Estas formulaciones tenían niveles de conservante de Novolog o EP-B con un alto pH (pH 7,6), lo que desfavorece la estabilidad de rHuPH20. La formulación individual EP-B (B4) que tenía una actividad de hialuronidasa < 375 U/ml tras 1 mes a 25 °C tenían un pH de 7,6 y baja concentración de cloruro de sodio (50 mM) que en combinación se vieron desfavorecidos respecto de rHuPH20. Las otras formulaciones EP-B a pH 7,6 con mayores concentraciones de cloruro de sodio (80 mM o 100 mM) permanecieron por encima del nivel diana de 375 U/ml de actividad enzimática de rHuPH20 tras 1 mes a 25 °C. Todas las demás formulaciones se encontraron por encima de la especificación diana tras 1 mes de almacenamiento a 25 °C. La insulina lispro fue estable en todas las formulaciones a 25 °C tras el instante de 1 mes, pero el porcentaje de pureza mediante RP-HPLC comenzó a reducirse ligeramente.

La rHuPH20 fue menos estable en todas las formulaciones mantenidas a 30 ± 2 °C en comparación con aquellas a 25 ± 2 °C. La formulación USP mantuvo una actividad aceptable de rHuPH20 durante 1 mes a 30 °C pero ninguna de las formulaciones de conservante comercial (A1-A4) o de EP-B (B1-B5) permanecieron por encima de la especificación diana tras 1 semana de almacenamiento a 30 °C. La insulina lispro permaneció estable dentro de la especificación diana durante 1 mes en todas las formulaciones a 30 °C pero el porcentaje de pureza mediante RP-HPLC se reduce ligeramente.

b. Insulina Aspart

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Todas las formulaciones fueron estables a 5 ± 3 °C hasta el instante de 1 mes tanto para rHuPH20 como para insulina Aspart. No se evaluaron las formulaciones a 15 ± 2 °C en el instante de un mes.

rHuPH20 fue estable en todas las formulaciones mantenidas a 25 ± 2 °C hasta 1 mes con la excepción de las formulaciones A4 y B4 que cayeron por debajo de la especificación diana de 375 U/ml entre 1-2 semanas y 2 semanas-1 mes, respectivamente. Estas formulaciones tenían niveles de conservante de Novolog® comercial o de EP-B con baja sal (50 mM) y alto pH (7,6), que cada una son condiciones que desfavorecen la estabilidad de rHuPH20. Todas las demás formulaciones se encontraron por encima de la especificación diana para la actividad enzimática de rHuPH20 tras 1 mes de almacenamiento a 25 °C. La insulina Aspart fue estable en todas las formulaciones a 25 °C hasta el instante de 1 mes. El contenido total de insulina Aspart fue menor del esperado, pero los valores son consistentes desde el instante = 0.

rHuPH20 fue menos estable en todas las formulaciones mantenidas a 30 ± 2 °C en comparación con aquellas a 25 ± 2 °C. La formulación USP (U1) mantuvo una actividad de rHuPH20 aceptable hasta 1 mes a 30 °C. Varias de las formulaciones EP-B mantuvieron una actividad de rHuPH20 aceptable hasta 1 semana pero ninguna de las formulaciones de conservante Novolog® mantuvieron una actividad aceptable tras 1 semana de almacenamiento a 30 °C. La insulina Aspart fue estable dentro de la especificación diana durante 1 mes para todas las formulaciones a 30 °C pero hay una ligera tendencia negativa perceptible para el porcentaje de pureza mediante RP-HPLC.

c. Insulina Glulisina

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Todas las formulaciones fueron estables a 5 ± 3 °C hasta el instante de 1 mes tanto para rHuPH20 como para insulina Glulisina. No se evaluaron las formulaciones a 15 ± 2 °C en el instante de un mes.

rHuPH20 fue estable en todas las formulaciones mantenidas a 25 ± 2 °C hasta 1 mes. Hubo cierta tendencia ligeramente negativa para algunas de las formulaciones respecto de la actividad de rHuPH20 y la pureza de rHuPH20 mediante RP-HPLC. La insulina Glulisina fue estable en todas las formulaciones a 25 °C hasta el instante de 1 mes, pero también mostró una tendencia ligeramente negativa con respecto a la pureza y al porcentaje de recuperación.

rHuPH20 fue menos estable en todas las formulaciones mantenidas a 30 ± 2 °C en comparación con aquellas a 25 ± 2 °C. Cuatro (4) de los 7 artículos de ensayo no llegaron a cumplir con la especificación de actividad de rHuPH20 diana de > 375 U/ml tras 1 semana a 30 °C. La formulación 6 mostró una actividad aceptable durante solo 1 semana, la formulación 2 demostró una actividad aceptable durante 2 semanas, y la formulación USP (n.º 3) mantuvo una actividad de rHuPH20 aceptable (532 U/ml) hasta 1 mes a 30 °C. La insulina Glulisina fue estable dentro de la especificación diana durante 1 mes en todas las formulaciones a 30 °C, pero hubo una tendencia negativa clara perceptible para el porcentaje de pureza y el porcentaje de recuperación mediante RP-HPLC.

2. Instante de 2 meses**a. Insulina Lispro**

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Todas las formulaciones ensayadas fueron estables a 5 ± 3 °C hasta el instante de 2 meses tanto para rHuPH20 como para insulina lispro.

Todos los artículos de ensayo también fueron estables a 15 ± 2 °C hasta el instante de 2 meses tanto para rHuPH20 como para insulina lispro. Hubo una tendencia ligeramente negativa para la actividad enzimática de rHuPH20, pero no otra tendencia negativa evidente en la estabilidad.

rHuPH20 no fue estable en las formulaciones de conservante comercial (A1-A4) a 25 ± 2 °C hasta los 2 meses, pero la formulación A3 tenía buena actividad tras 1 mes (436 U/ml) y se encontró únicamente ligeramente por debajo de la especificación prevista de > 375 U/ml a los 2 meses (361 U/ml). Cuatro (4) de las 5 formulaciones EP-B (B1, B2, B3, y B5) se encontraron por encima de la especificación diana de 375 U/ml tras 2 meses a 25 °C y tuvo una buena pureza y recuperación de rHuPH20. La formulación USP (U1) también se encontró por encima de la especificación diana de rHuPH20 tras 2 meses a 25 °C con un valor de 510 U/ml y los correspondientes valores de elevada pureza y recuperación. La insulina lispro fue estable en todas las formulaciones a 25 °C hasta el instante de 2 meses, pero continuaron las tendencias negativas identificadas tras 1 mes.

Tal como se identificó tras 1 mes, rHuPH20 fue menos estable en todas las formulaciones mantenidas a 30 ± 2 °C en comparación con aquellas a 25 ± 2 °C y todas las formulaciones A (conservante comercial) y B (conservante EP-B) se encontraron bien por debajo de la especificación de actividad de rHuPH20 tras 2 meses a 30 °C. La

formulación USP solo mantuvo actividad de rHuPH20 aceptable (375 U/ml) hasta 2 meses a 30 °C, pero se encontró por debajo de la especificación en el instante de 1 mes (334 U/ml). Esto puede deberse a la variabilidad inherente en el ensayo de actividad de rHuPH20 o a la variación de las muestras, pero sigue demostrando la tendencia negativa en la estabilidad a 30 °C. La insulina lispro fue estable dentro de la especificación diana durante 2 meses en todas las formulaciones a 30 °C, pero definitivamente hay una tendencia negativa perceptible para el porcentaje de pureza y recuperación mediante RP-HPLC así como en el porcentaje de pureza mediante SEC no desnaturalizante.

b. Insulina Aspart

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Todas las formulaciones fueron estables a 5 ± 3 °C hasta el instante de 2 meses tanto para rHuPH20 como para insulina Aspart. Todos los artículos de ensayo también fueron estables a 15 ± 2 °C hasta el instante de 2 meses tanto para rHuPH20 como para insulina Aspart. Se observó una ligera disminución para la actividad enzimática, pureza y recuperación de rHuPH20.

rHuPH20 no fue estable en 3 de las 4 formulaciones de conservante comercial (A2, A3 y A4) a 25 ± 2 °C hasta 2 meses, pero la formulación A1 tenía una actividad aceptable tras 2 meses (385 U/ml) y el artículo de ensayo A3 se encontró únicamente ligeramente por debajo de la especificación prevista de > 375 U/ml a los 2 meses (357 U/ml). Tres (3) de las 5 formulaciones EP-B (B1, B2 y B3) se encontraron aún por encima de la especificación diana de 375 U/ml para la actividad enzimática de rHuPH20 tras 2 meses a 25 °C y tuvieron una pureza y recuperación de rHuPH20 atípicamente menor de la esperada basándose en la experiencia con formulaciones similares. La formulación USP (U1) se encontró aún por encima de la especificación diana de actividad de rHuPH20 tras 2 meses a 25 °C con un valor de 444 U/ml con pureza y actividades aceptables. La insulina Aspart fue estable en todas las formulaciones a 25 °C hasta el instante de 2 meses pero hubo tendencias ligeramente negativas en la pureza mediante RP-HPLC y SEC no desnaturalizante.

Tal como se identificó tras 1 mes, rHuPH20 fue menos estable en todas las formulaciones mantenidas a 30 ± 2 °C en comparación con aquellas a 25 ± 2 °C, y todas las formulaciones A y B se encontraron bien por debajo de la especificación de actividad enzimática diana de rHuPH20 tras 2 meses a 30 °C. La formulación USP (U1) tuvo una actividad de rHuPH20 aceptable (382 U/ml) hasta los 2 meses a 30 °C. El porcentaje de pureza y recuperación de rHuPH20 para la formulación USP fueron ligeramente menores de los esperados basándose en la experiencia con formulaciones similares, tal como se describe anteriormente pero se encontraron dentro de límites aceptables. La insulina Aspart fue estable dentro de la especificación diana durante 2 meses en todas las formulaciones a 30 °C pero fue perceptible una tendencia negativa para el porcentaje de pureza mediante RP-HPLC así como en el porcentaje de pureza mediante SEC desnaturalizante y no desnaturalizante. Los bajos porcentajes de recuperación observados para los instantes previos ya no fueron evidentes y los valores para el porcentaje de recuperación de insulina Aspart mediante RP-HPLC fueron ligeramente aumentados entre 1 y 2 meses para todas las temperaturas (más evidente a 30 °C).

c. Insulina Glulisina

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Todas las formulaciones ensayadas fueron estables dentro de las especificaciones diana a 5 ± 3 °C hasta el instante de los 2 meses tanto para rHuPH20 como para insulina Glulisina.

Todos los artículos de ensayo fueron estables dentro de las especificaciones diana a 15 ± 2 °C en el instante de los 2 meses tanto para rHuPH20 como para insulina Glulisina. Los datos de 2 meses fueron en general ligeramente menores para la actividad y la recuperación de rHuPH20 pero el porcentaje de pureza permaneció siendo el mismo, excepto en la formulación n.º 5 (sin metionina añadida) que tenían un porcentaje de pureza significativamente menor a los 2 meses. La insulina glulisina también fue estable dentro de las especificaciones diana a 15 °C hasta el instante de 2 meses, mostrando únicamente valores ligeramente menores tras 2 meses a 15 °C para el porcentaje de pureza y recuperación.

La actividad de rHuPH20 se encontró bien por encima de las especificaciones preliminares (<375 U/ml) para 3 de las 7 formulaciones (n.º 2, n.º 3 y n.º 6) mantenidas a 25 ± 2 °C hasta 2 meses y justo por encima de las especificaciones para la formulación n.º 4. En general, estas formulaciones contenían bien los niveles menores de conservante (n.º 2 y n.º 3) o más sal y menor pH (n.º 6). La formulación n.º 4, que se encontraba justo por encima de la especificación de actividad de rHuPH20, tenía el nivel más alto de conservante y pH en el estudio, pero también contenía una concentración mayor de NaCl. Hubo una tendencia negativa para todas las formulaciones respecto de la actividad, pureza y contenido de rHuPH20. La insulina Glulisina fue estable en todas las formulaciones a 25 °C hasta el instante de 2 meses, pero continuó la tendencia ligeramente negativa con respecto a la pureza y al porcentaje de recuperación identificada tras 1 mes.

rHuPH20 fue menos estable en todas las formulaciones mantenidas a 30 ± 2 °C en comparación con aquellas a 25 ± 2 °C. Solo la formulación con nivel de conservante USP (n.º 3) cumplió con la especificación de actividad diana de > 375 U/ml tras 2 meses a 30 °C. La formulación n.º 3 también mostró una pureza y recuperación de rHuPH20

aceptable en el instante de 2 meses. La insulina Glulisina fue estable dentro de las especificaciones diana durante 2 meses en todas las formulaciones a 30 °C, pero hubo una tendencia negativa clara perceptible para el porcentaje de pureza y el porcentaje de recuperación mediante RP-HPLC.

5 3. Instante de 3 meses

a. Insulina Lispro

10 Todas las formulaciones fueron estables a 5 ± 3 °C hasta el instante de 3 meses tanto para rHuPH20 como para insulina lispro. La pureza de rHuPH20 mediante RP-HPLC tuvo valores ligeramente menores a los esperados, pero esto parece deberse a la variación normal del ensayo. Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas, excepto la formulación A3, en la que se identificó que contenía "2 hebras rojas extrañas".

15 Todas las formulaciones cumplieron todas las especificaciones diana a 15 ± 2 °C hasta el instante de 3 meses tanto para rHuPH20 como para insulina lispro. La pureza de rHuPH20 mediante RP-HPLC también tuvo valores ligeramente menores a los esperados, lo que, tal como se mencionó anteriormente parece deberse a variaciones normales del ensayo. Hay una cierta tendencia negativa para la actividad de rHuPH20 y la pureza de la insulina Lispro mediante SEC no desnaturizante pero ninguna otra tendencia negativa.

20 rHuPH20 no fue estable en las formulaciones de conservante comercial (A1-A4) a 25 ± 2 °C hasta los 3 meses. Cuatro (4) de las 5 formulaciones EP-B (B1, B2, B3, y B5) se encontraron aún por encima de la especificación diana de 375 U/ml para la actividad enzimática de rHuPH20 tras 3 meses a 25 °C, y tienen una tendencia negativa aunque aceptable de pureza y recuperación de rHuPH20. La formulación USP (U1) se encontró bien por encima de la especificación diana de rHuPH20 tras 3 meses a 25 °C con un valor de 522 U/ml y los correspondientes valores de elevada pureza y recuperación. La insulina Lispro fue estable en todas las formulaciones a 25 °C hasta el instante de los 3 meses, pero fueron evidentes tendencias negativas para la pureza de insulina lispro mediante RP-HPLC y SEC no desnaturizante.

30 Tal como se identificó anteriormente, rHuPH20 fue menos estable en todas las formulaciones mantenidas a 30 ± 2 °C en comparación con aquellas a 25 ± 2 °C y todas las formulaciones se encontraron por debajo de la especificación diana de actividad de rHuPH20 tras 3 meses a 30 °C. La insulina lispro fue estable dentro de la especificación diana durante 3 meses en todas las formulaciones a 30 °C, pero hay tendencias definitivamente negativas para el porcentaje de pureza mediante RP-HPLC así como en el porcentaje de pureza mediante SEC no desnaturizante.

b. Insulina Aspart

40 Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Todas las formulaciones ensayadas fueron estables a 5 ± 3 °C hasta el instante de 3 meses tanto para rHuPH20 como para insulina Aspart. Todas las formulaciones cumplieron todas las especificaciones diana a 15 ± 2 °C hasta el instante de 3 meses tanto para rHuPH20 como para insulina Aspart. Hubo cierta tendencia negativa para la actividad, pureza y recuperación de rHuPH20. La pureza de insulina Aspart mediante SEC no desnaturizante fue ligeramente menor que en el instante de 2 meses, pero no está claro si esta es una tendencia negativa o una variabilidad normal del ensayo.

50 rHuPH20 no fue estable en las formulaciones de conservante comercial, pero la formulación A1 se encontró únicamente por debajo de la especificación de actividad diana de rHuPH20 (< 375 U/ml) a los 3 meses (369 U/ml). Tres (3) de las 5 formulaciones EP-B (B1, B2 y B3) se encontraron aún bien por encima de la especificación diana de 375 U/ml tras 3 meses a 25 ± 2 °C y tuvieron una pureza y recuperación de rHuPH20 aceptable pero inesperadamente baja tal como se menciona en el resumen de 2 meses. La formulación USP (U1) se encontró aún por encima de la especificación diana de actividad de rHuPH20 tras 3 meses a 25 °C con un valor de 492 U/ml con pureza y actividades aceptables. La insulina Aspart fue estable en todas las formulaciones a 25 °C hasta el instante de 3 meses pero hubo tendencias claramente negativas en la pureza mediante RP-HPLC y SEC no desnaturizante.

60 Tal como se discutió anteriormente, rHuPH20 fue menos estable en todas las formulaciones mantenidas a 30 ± 2 °C en comparación con aquellas a 25 ± 2 °C. Todas las formulaciones A y B se encontraron por debajo de la especificación de actividad diana de rHuPH20 tras 1 mes a 30 °C. La formulación USP (U1) se encontró solo ligeramente por debajo de la especificación prevista de > 375 U/ml a los 3 meses (371 U/ml) pero también tuvo un bajo porcentaje de pureza y porcentaje de recuperación de rHuPH20 mediante RP-HPLC. La insulina aspart fue estable dentro de la especificación diana durante 3 meses en todas las formulaciones a 30 °C mediante todas las técnicas, excepto en la SEC no desnaturizante, que mostró una reducción muy ligera a aproximadamente el 97 % del pico principal para todas las formulaciones.

65 4. Instante de 6 meses

a. Insulina Lispro

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Las formulaciones a 30 ± 2 °C no se evaluaron en el instante de 6 meses.

Todas las formulaciones fueron estables a 5 ± 3 °C y a 15 ± 2 °C hasta el instante de 6 meses tanto para rHuPH20 como para insulina lispro. Hubo una ligera tendencia negativa para la actividad de rHuPH20 y el porcentaje de recuperación de rHuPH20 para todas las formulaciones. La formulación A4 fue la menos estable a ambas temperaturas.

Solo las formulaciones B3 y U1 cumplieron con los requisitos de estabilidad a 25 ± 2 °C. Ambas de estas formulaciones tuvieron un pH de 7,4 y 80 mM de sal. Las demás formulaciones tenían una actividad enzimática de rHuPH20 menor de 375 U/ml. La pérdida de actividad coincidió con una pérdida en el porcentaje de recuperación de rHuPH20. La SEC no desnaturalizante mostró una tendencia ligeramente negativa en el porcentaje de pureza de insulina lispro.

b. Insulina Aspart

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Las formulaciones a 30 ± 2 °C no se evaluaron en el instante de 6 meses.

Todas las formulaciones fueron estables a 5 ± 3 °C y a 15 ± 2 °C hasta el instante de 6 meses tanto para rHuPH20 como para insulina aspart. Hubo una ligera tendencia negativa para la actividad de rHuPH20 y el porcentaje de recuperación de rHuPH20 para todas las formulaciones. La formulación A4 fue la menos estable a ambas temperaturas.

Solo la formulación U1 cumplió con los requisitos de estabilidad a 25 ± 2 °C. Las demás formulaciones tuvieron una actividad enzimática de rHuPH20 menor de 375 U/ml. La pérdida de actividad coincidió con una pérdida en el porcentaje de recuperación de rHuPH20. La SEC no desnaturalizante mostró una tendencia ligeramente negativa en el porcentaje de pureza de insulina aspart.

5. Instante de 9 meses**a. Insulina Lispro**

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Las formulaciones a 25 ± 2 °C y a 30 ± 2 °C no se evaluaron en el instante de 9 meses.

Todas las formulaciones fueron estables a 5 ± 3 °C y a 15 ± 2 °C hasta el instante de 9 meses tanto para rHuPH20 como para insulina lispro. Hubo una ligera tendencia negativa para la actividad de rHuPH20 y el porcentaje de recuperación de rHuPH20 para todas las formulaciones. Tal como se observó a los 6 meses, la formulación A4 es la menos estable a ambas temperaturas.

b. Insulina Aspart

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes y temperaturas. Las formulaciones a 25 ± 2 °C y a 30 ± 2 °C no se evaluaron en el instante de 9 meses.

Todas las formulaciones fueron estables a 5 ± 3 °C y a 15 ± 2 °C hasta el instante de 9 meses tanto para rHuPH20 como para insulina aspart. Hubo una ligera tendencia negativa para la actividad de rHuPH20 y el porcentaje de recuperación de rHuPH20 para todas las formulaciones. Tal como se observó a los 6 meses, La formulación A4 fue la menos estable a ambas temperaturas.

Ejemplo 14**Estudio de estabilidad acelerada de Aspart-rHuPH20 y Lispro-rHuPH20: Congelación/descongelación, agitación y alta temperatura de almacenamiento**

En este ejemplo, se evaluó la estabilidad de diversas formulaciones de insulina Aspart-rHuPH20 e insulina Lispro-rHuPH20 en tres condiciones de estrés físico acelerado: múltiples ciclos de congelación/descongelación; agitación a 25 °C, y estrés térmico a 37 °C. La estabilidad se evaluó midiendo la apariencia y características generales, la actividad enzimática de rHuPH20 y la pureza de rHuPH20 y del análogo de insulina.

Las formulaciones de análogo de insulina/rHuPH20 se exponen en la tabla 64 a continuación. Como controles se usaron una muestra de Humalog® (insulina Lispro, formulación 4) y una muestra de NovoLog® (insulina Aspart, formulación 8). Las formulaciones base contenían 3,47 mg/ml de insulina Lispro o 3,5 mg/ml de insulina Aspart, 600

ES 2 566 549 T3

U/ml de rHuPH20, Tris/HCl 30 mM, y poloxamer 188 al 0,01 %. Las formulaciones 1 y 5 contenían además NaCl 50 mM, metionina 100 mM, 0,13 % de fenol y 0,075 % de m-cresol, con un pH de 7,4. Las formulaciones 2 y 6 (formulaciones EP-B) contenían además NaCl 80 mM, metionina 20 mM y glicerina 50 mM con un nivel de conservante EP-B: 0,15 % de fenol y 0,175 % de m-cresol. Las formulaciones 3 y 7 (formulaciones USP) contenían además NaCl 80 mM, metionina 20 mM y glicerina 50 mM con un nivel de conservante USP: 0,13 % de fenol y 0,075 % de m-cresol.

Tabla 64. Formulaciones de insulina

n.º	PH	Tampón	Modificador de la tonicidad			Tensioactivo	Conservantes		API	
			NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	—		Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,13 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20
1	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	—	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,13 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,47 mg/ml de Lispro
2	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,175 %	600 U/ml de rHuPH20	3,47 mg/ml de Lispro
3	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,13 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,47 mg/ml de Lispro
4	7,0-7,8	—	—	—	—	—	—	m-cresol al 0,315 %	Humalog®	—
5	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 50 mM	Metionina 100 mM	—	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,13 %	m-cresol al 0,075 % 1 m-cresol	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart
6	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,175 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart
7	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Metionina 20 mM	Glicerina 50 mM	Poloxamer 188 al 0,01 %	Fenol al 0,13 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml de rHuPH20	3,5 mg/ml de Aspart
8	7,2-7,6	—	—	—	—	—	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,172 %	Novolog®	—

Cada formulación se expuso a las siguientes condiciones de degradación aceleradas:

(1) Agitación a 25 °C: Cada formulación se mantuvo en un incubador a 25 °C dotado de un agitador. Los viales se mantuvieron en vertical con agitación a 650 rpm. Las muestras se retiraron para su análisis tras agitarlas durante 6, 12 y 24 horas. Todas las muestras se almacenaron a 2-8 °C antes del análisis.

(2) Múltiples ciclos de congelación/descongelación: Cada formulación se sometió a 5 ciclos de congelación/descongelación alternando las condiciones de almacenamiento entre un congelador a -30 °C y temperatura ambiente en banco de trabajo. Las muestras se dejaron en cada condición durante al menos 2 horas para cada ciclo (es decir 2 horas en un congelador a -30 °C, retirando y colocando sobre el banco de trabajo a temperatura ambiente durante 2 horas, lo que se considera 1 ciclo). Las muestras se retiraron tras 1, 3 y 5 ciclos y se almacenaron a 2-8 °C antes de su análisis.

(3) Estrés térmico: Cada formulación se mantuvo en un incubador a 37 °C. Las muestras se retiraron tras 8, 24 y 48 horas y las muestras se almacenaron a 2-8 °C antes de su análisis.

El análisis se llevó a cabo antes y después de aplicarse las condiciones de estrés. Todas las formulaciones se caracterizaron mediante un conjunto completo de pruebas analíticas, incluyendo la apariencia, osmolalidad, pH, turbidez, actividad enzimática de hialuronidasa, pureza de hialuronidasa, y pureza de insulina, pureza y contenido de HWM (véanse los ejemplos 2-5 y 12 anteriores para los procedimientos de ensayo). Los criterios de aceptación de estabilidad o la especificación diana para cada parámetro ensayado son los mismos a los descritos en el ejemplo 12. Los resultados se resumen a continuación.

1. Agitación a 25 °C

Las formulaciones EP-B (n.º 2 y n.º 6) y las formulaciones de control (n.º 4 y n.º 8) fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes. Las formulaciones USP (n.º 3 y n.º 7) fueron transparentes e incoloras tras 6 horas de agitación pero se había formado un precipitado en el instante de 12 horas. Las formulaciones n.º 1 y n.º 5 habían precipitado en el instante de 6 horas.

rHuPH20 fue estable en todas las formulaciones en todos los instantes, teniendo una actividad enzimática de >375 U/ml. El porcentaje de recuperación de rHuPH20 se redujo ligeramente en todos los instantes sucesivos, pero todas las formulaciones mantuvieron un nivel de recuperación aceptable. La insulina Aspart y la insulina Lispro fueron estables en todos los instantes. Los controles de NovoLog® (insulina Aspart) y Humalog® (insulina Lispro) fueron estables en todos los instantes.

2. Congelación/descongelación

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes. Después de 1 ciclo de congelación/descongelación, la actividad enzimática de rHuPH20 se redujo en gran medida (la formulación mayor, n.º 3, tuvo una actividad de 168 U/ml), aunque el porcentaje de pureza permaneció > 95 % para todas las formulaciones e instantes. El porcentaje de pureza de rHuPH20 se encontró por debajo de los niveles aceptables para la mayoría de las formulaciones. La insulina Aspart y la insulina Lispro fueron estables en todos los instantes. NovoLog® (insulina Aspart) y Humalog® (insulina Lispro) fueron estables en todos los instantes.

3. Estrés térmico a 37 °C

Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas en todos los instantes. Las formulaciones n.º 1, n.º 3, n.º 5 y n.º 7 tuvieron una actividad enzimática de rHuPH20 aceptable (>375 U/ml) tras 8 horas a 37 °C. La estabilidad de rHuPH20 se redujo en todos los instantes posteriores para todas las formulaciones, tal como se evidencia por una reducción en la actividad de rHuPH20 (por debajo de 375 U/ml) y una disminución en el porcentaje de recuperación. La insulina Aspart y la insulina Lispro fueron estables en todos los instantes. Los controles de NovoLog® (insulina Aspart) y Humalog® (insulina Lispro) fueron estables en todos los instantes.

Ejemplo 15

Efecto de los oligómeros de HA en la estabilidad de la formulación de insulina/rHuPH20

En este ejemplo, se evaluó el efecto de la adición de oligómeros de HA en la estabilidad de diversas formulaciones de insulina/rHuPH20. En primer lugar, se llevaron a cabo pruebas para evaluar la estabilidad en cuatro condiciones de almacenamiento: 5 °C, 25 °C, 30 °C y 35 °C a lo largo del tiempo. En segundo lugar, se evaluó el efecto de los oligómeros de HA en la estabilidad de rHuPH20 en presencia de diferentes conservantes. En tercer lugar, se evaluó el efecto estabilizante de diferentes tamaños de oligómeros de HA para las formulaciones de insulina aspart-rHuPH20.

A. Efecto de los oligómeros de HA en la estabilidad de almacenamiento

Las formulaciones contenían diversas cantidades de HA (10, 15 o 20 mg/ml). Las formulaciones adicionales contenían 15 mg/ml de HA a varios pH y concentraciones de glicerina y sal.

Las formulaciones de insulina/rHuPH20 se exponen en la tabla 65 a continuación. Las formulaciones básicas contienen 3,5 mg/ml de insulina, 600 U/ml (5 µg/ml) de rHuPH20, Tris/HCl 30 mM, NaCl 80 mM, metionina 20 mM y poloxamer 188 al 0,01 % (Poloxamer 188) con fenol al 0,1 % y m-cresol al 0,15 % a pH 7,4. Las formulaciones n.º 2 - n.º 4 contenían además 10, 15 y 20 mg/ml de oligómeros de HA, respectivamente. Las formulaciones n.º 1 y n.º 6 contenían además glicerina 50 mM, conteniendo la formulación n.º 6 15 mg/ml de oligómeros de HA. Las formulaciones n.º 5 y n.º 7 variaron respecto de la formulación n.º 3 en su pH y concentraciones de NaCl. Se evaluaron tres formulaciones adicionales (n.º 8-n.º 10) que no contenían metionina, y que contenían cada una 3,5 mg/ml de insulina, 600 U/ml de rHuPH20, 15 mg/ml de oligómeros de HA, Tris/HCl 30 mM, NaCl 80 mM y poloxamer 188 al 0,01 % con fenol al 0,1 % y m-cresol al 0,15 % a pH 7,4. La formulación n.º 8 contenía además metionina 20 mM y la formulación n.º 10 contenía además glicerina 50 mM.

Tabla 65. Formulaciones que contienen 600 U/ml de rHuPH20 y 3,5 mg/ml de insulina

n.º	pH	Tampón	Modificador de la tonicidad		Estabilizante	Conservantes			
			NaCl	Glicerina		Metionina	F68	Fenol	m-cresol
1	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM		Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
2	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM		10 mg/ml HA	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
3	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM		15 mg/ml HA	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
4	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM		20 mg/ml HA	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
5	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM		15 mg/ml HA	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	Tricresol al 0,15 %
6	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM	15 mg/ml HA	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
7	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 100 mM		15 mg/ml HA	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
8	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM		15 mg/ml HA	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
9	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM		15 mg/ml HA		F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
10	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM	15 mg/ml HA		F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %

Se almacenó un (1) ml de cada formulación en viales de vidrio de 2 ml de borosilicato de tipo 1 USP con un tapón de goma de clorobutilo y un sello de aluminio. Cada formulación se incubó, individualmente, a 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C, 30 ± 2 °C y 35 ± 2 °C y las mediciones de estabilidad se registraron a en el instante t = 0, 2, 5, 7 y 9 días, 1 y 2 semanas, 1 mes o 2 meses. La estabilidad se evaluó midiendo el pH, la apariencia, osmolalidad, la actividad enzimática de rHuPH20, el contenido de rHuPH20 mediante RP-HPLC, el contenido de insulina mediante RP-HPLC, y el porcentaje de pureza de insulina mediante SEC no desnaturizante (véanse los ejemplos 2-5 y el ejemplo 12). Los criterios de aceptación de estabilidad o la especificación diana para cada parámetro ensayado son los mismos a los descritos en el ejemplo 12.

1. 5 °C

Todas las formulaciones que contenían al menos 15 mg/ml de oligómeros de HA contenían partículas visibles tras solo 1 semana a 5 °C. Las formulaciones que contenían únicamente 10 mg/ml de oligómeros de HA o sin oligómeros de HA fueron transparentes, incoloras y no contenían partículas tras 2 semanas a 5 °C, pero se observaron partículas tras 1 mes. Todas las formulaciones ensayadas fueron estables a 5 °C hasta el instante de 2 meses para rHuPH20. La insulina fue inestable en las formulaciones que contenían 20 mg/ml de oligómeros de HA (n.º 4), que tenían menor pH (n.º 5) y que contenían más sal (n.º 7), tras solo 1 mes a 5 °C.

2. 25 °C

Las formulaciones n.º 5 (bajo pH) y n.º 7 (alto contenido de sal) contenían partículas tras solo 1 semana a 25 °C. Las demás formulaciones fueron todas transparentes e incoloras y no contenían partículas. Todas las formulaciones ensayadas fueron estables a 25 °C hasta el instante de 2 meses tanto para rHuPH20 como para insulina.

3. 30 °C

- Las formulaciones n.º 5 (bajo pH) y n.º 7 (alto contenido de sal) contenían partículas tras solo 1 semana a 30 °C. Las demás formulaciones fueron todas transparentes e incoloras y no contenían partículas. Todas las formulaciones que contenían HA fueron estables durante 1 mes a 30 °C para rHuPH20. En el instante de 2 meses, la actividad enzimática de rHuPH20 se había reducido por debajo de los niveles aceptables de 375 U/ml. La insulina fue estable en todas las formulaciones en el instante de 1 mes, con una clara reducción en la estabilidad observada tras 2 meses a 25 °C. Los oligómeros de HA adicionales tuvieron un efecto positivo claro en la estabilidad de rHuPH20 a 25 °C sin afectar a la estabilidad de la insulina.
- Las formulaciones n.º 8-n.º 10 se ensayaron respecto de la oxidación de rHuPH20 en el instante cero y tras 3 días a 25 °C. La formulación n.º 10 que contenía glicerina 50 mM mostró oxidación aumentada tras solo 3 días a 25 °C.

4. 35 °C

- Las formulaciones que contenían oligómeros de HA fueron estables durante 2 días a 35 °C para rHuPH20. A los 5 días, solo las formulaciones n.º 3 y n.º 5, que contenían 15 mg/ml de oligómeros de HA, con diversos pH, fueron estables para rHuPH20. El contenido de rHuPH20 fue bajo en todas las formulaciones tras solo 2 días a 35 °C. La adición de oligómeros de HA tuvo un efecto positivo evidente en la estabilidad de rHuPH20 a 35 °C sin afectar a la estabilidad de la insulina.

B. Efectos conservantes

1. Conservantes USP

- En este ejemplo, se evaluó la capacidad de los oligómeros de HA para estabilizar a las formulaciones de insulina aspart-rHuPH20 o insulina lispro-rHuPH20 que contenían niveles USP de conservantes, según se determinó mediante la actividad enzimática de rHuPH20. Se ensayaron las formulaciones F1-F7. Las formulaciones básicas contenían 3,5 mg/ml de insulina aspart o de insulina lispro, 600 U/ml de rHuPH20, Tris/HCl 30 mM, pH 7,4, metionina 5 mM, Poloxamer 188 al 0,01 %, 0,125 % de fenol y 0,075 % de m-cresol. La formulación F1 no contenía insulina Aspart. La actividad enzimática de rHuPH20 se midió tal como se describe en el ejemplo 2B anterior. Los resultados se exponen en las tablas 66-67 a continuación. Todas las formulaciones fueron estables a 5 °C durante 3 o 6 días. Todas las formulaciones que contenían HA, independientemente de su pH y concentraciones de NaCl, tuvieron actividades enzimáticas mayores que las mismas formulaciones que no contenían HA. Tal como se observa en la tabla 66 a continuación, la formulación F4 que contenía 10 mg/ml de HA tenía mayor actividad enzimática de rHuPH20 a lo largo del tiempo a 37 °C en comparación con las formulaciones F2 y F3, que no contenían HA, bien al mismo o a un pH más bajo. Para la formulación F5 (véase la tabla 67 a continuación), que tenía una concentración de NaCl reducida, la adición de 10 mg/ml en la formulación limitó la pérdida de la actividad de rHuPH20 debido a la menor concentración de NaCl, que es desestabilizante para rHuPH20 (véase, por ejemplo, F3).

Tabla 66. Actividades enzimáticas para las formulaciones de insulina Aspart-PH20

Form. n.º	pH	NaCl mM	HA mg/ml	Actividad enzimática de rHuPH20 (U/ml)					
				5 °C		37 °C			
				6d	2d	4d	6d	8d	12d
F1	7,0	200	0	679	575	553	513	481	487
F2	7,0	140	0	674	512	454	394	400	346
F3	7,2	140	0	671	481	424	363	352	302
F4	7,2	140	10	667	542	491	442	431	371
F5	7,2	100	10	658	517	432	392	385	319

Tabla 67. Actividades enzimáticas para las formulaciones de insulina Lispro-PH20

Form. n.º	pH	NaCl mM	HA mg/ml	Actividad (U/ml)			
				5 °C		37 °C	
				3d	3d	5d	7d
F1	7,2	140	0	641	248	141	98
F2	7,2	140	10	642	426	323	284
F3	7,2	120	10	650	431	363	288
F4	7,2	100	10	643	420	350	253
F5	7,2	80	10	659	419	349	229
F6	7,4	120	10	642	353	284	175

Form. n.º	pH	NaCl mM	HA mg/ml	Actividad (U/ml)			
				5 °C		37 °C	
				3d	3d	5d	7d
F7	7,4	100	10	643	345	264	158

2. Nivel de conservante EP-B

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de los oligómeros de HA para estabilizar las formulaciones de insulina-rHuPH20 con niveles EP-B de conservantes, según se determinó mediante la actividad enzimática de rHuPH20. Las formulaciones básicas contienen 3,5 mg/ml de insulina, 600 U/ml de rHuPH20, Tris/HCl 30 mM, pH 7,4, metionina 20 mM, Poloxamer 188 al 0,01 %, fenol al 0,10 % y m-cresol al 0,15 %. La actividad enzimática de rHuPH20 se midió tal como se describe en el ejemplo 2B anterior. Los resultados se exponen en la tabla 68 a continuación. A 35 °C, las formulaciones que contenían HA (F2-F6) tenían todas actividades enzimáticas de rHuPH20 mayores que la formulación F1, que no contenía HA. En el día 9, quedaba solo aproximadamente el 10 % de la actividad enzimática para F1, mientras que las formulaciones F2-F6, dependiendo de su pH, concentraciones de HA y NaCl, aún tenían aproximadamente del 30 % al 60 % de la actividad enzimática de rHuPH20. Se observaron resultados similares para estas formulaciones incubadas a 30 °C durante un estudio de estabilidad a más largo plazo. Tal como se observa en la tabla 68 a continuación, al final del almacenamiento de 3 meses a 30 °C, permaneció aproximadamente un 30 % de la actividad enzimática de rHuPH20 para la formulación F1 que no contenía HA; para todas las formulaciones que contenían HA, de media, permaneció una actividad enzimática de rHuPH20 ligeramente por encima del 50 %.

A una temperatura menor, rHuPH20 experimentó menor estrés térmico, lo que puede explicar la menor diferencia con respecto a los cambios de actividad enzimática relativa entre formulaciones con y sin HA. Cabe destacar que en las mismas condiciones de pH y NaCl, la actividad de rHuPH20 no se correlaciona con la concentración de HA ensayada en este estudio. Debido al hecho de que HA es un sustrato para rHuPH20, su mecanismo estabilizante se relaciona más probablemente con el efecto de unión de enzima-sustrato específico. Esta interacción se ve ciertamente afectada por la relación molar entre las dos moléculas. A una determinada relación sustrato:enzima, se alcanza el efecto estabilizante máximo y la adición de más HA no mejora adicionalmente la actividad. En este ejemplo, se necesitaron aproximadamente 10 mg/ml de HA para estabilizar 5 µg/ml de rHuPH20.

Form. n.º	pH	NaCl mM	HA mg/ml	Actividad (U/ml)						
				5 °C		35 °C			30 °C	
				0d	2d	5d	9d	1 m,	2 m,	3 m,
F1	7,4	80	0	592	254	170	64	358	239	194
F2	7,4	80	10	604	434	365	209	465	342	296
F3	7,4	80	15	559	444	380	269	463	348	288
F4	7,4	80	20	556	438	364	287	459	323	286
F5	7,2	80	15	559	471	397	326	504	365	312
F6	7,4	100	15	556	457	312	278	461	365	299

C. Efecto del peso molecular de HA en la estabilización de rHuPH20

En este ejemplo, se evaluó el efecto estabilizante de diferentes tamaños de oligómeros de HA para las formulaciones de insulina aspart-rHuPH20 según se determinó midiendo la actividad enzimática de rHuPH20. Se adquirieron tres hialuronatos de sodio de diferentes pesos moleculares a través de Lifecore Biomedical (Minnesota, EE.UU): 6,4 kDa (Lote: GSP252-5-7), 74 kDa (Lote: GSP252-60-2) y 234,4 kDa (Lote: 002799). Se añadieron diez (10) mg de cada HA a 1 ml de una formulación de insulina aspart-PH20 que contenía 100 U/ml de insulina aspart, 5 µg/ml de rHuPH20, Tris/HCl 30 mM, pH 7,4, NaCl 80 mM, glicerol 50 mM, metionina 20 mM, Poloxamer 188 al 0,01 %, fenol al 0,10 %, y m-cresol al 0,15 %. También se incluyó en el estudio una formulación que no contenía HA como control. Estas soluciones se incubaron a 5 °C y 37 °C durante hasta 9 días para evaluar el efecto estabilizante de diferentes tamaños de HA en la actividad enzimática de rHuPH20. La actividad enzimática de rHuPH20 se midió tal como se describe en el ejemplo 2B anterior.

Los resultados se muestran en la tabla 69 a continuación. La formulación de insulina aspart-rHuPH20 que no contenía HA (F1) fue enzimáticamente inactiva tras 3 días de incubación a 37 °C. Por el contrario, las formulaciones F2-F4 retenían aproximadamente un 30-40 % de la actividad enzimática de rHuPH20. En general, hubo una tendencia hacia que los polímeros de HA más pequeños parecieran proporcionar una mejor protección que los mayores. Esto podría deberse posiblemente debido al tamaño de HA solo o a la relación molar de HA a rHuPH20.

Tabla 69. Efecto del peso molecular de HA en la actividad enzimática de rHuPH20

Formulación	PM de HA, kDa	Actividad (U/ml)				
		5 °C	37 °C			
		9d	3d	5d	7d	9d
F1	NA	600	34	2	-15	-16
F2	6,4	645	279	145	59	27
F3	74,0	585	211	94	30	10
F4	234,4	575	161	52	5	-6

Ejemplo 16**5 Estabilidad de las formulaciones de insulina Aspart/rHuPH20**

En este ejemplo, se evaluaron varias formulaciones de insulina Aspart/rHuPH20 respecto de su estabilidad en dos condiciones de almacenamiento, 30 °C y 37 °C, y en condiciones aceleradas (agitación a 25 °C durante 9 días). Las formulaciones de insulina/rHuPH20 ensayadas se exponen en la tabla 70 a continuación. La formulación de referencia (n.º 7) contenía 3,5 mg/ml de insulina Aspart, 600 U/ml (5 µg/ml) de rHuPH20, Tris/HCl 30 mM, NaCl 80 mM, glicerina 50 mM, metionina 20 mM y poloxamer 188 al 0,01 % (Poloxamer 188) con fenol al 0,1 % y m-cresol al 0,15 % a pH 7,4. Las formulaciones n.º 1-n.º 3 se ensayaron con los niveles de conservante de fenol al 0,13 % y m-cresol al 0,12 % con 3 niveles diferentes del estabilizante poloxamer 188. Las formulaciones n.º 4-n.º 6 se ensayaron con los niveles de conservante de fenol al 0,15 % y m-cresol al 0,12 % con 3 niveles diferentes del estabilizante poloxamer 188. Las formulaciones n.º 8 y n.º 9 contenían además 10 mg/ml de oligómeros de HA teniendo la formulación n.º 8 un menor nivel de glicerina (20 mM). Las formulaciones n.º 10 y n.º 11 contenían un nivel menor de metionina (5 mM) y la n.º 11 contenía además 10 mg/ml de oligómeros de HA.

Tabla 70. Formulaciones que contienen 600 U/ml de rHuPH20 y 3,5 mg/ml de insulina Aspart

n.º	pH	Tampón	Modificador de la tonicidad		Estabilizante	Conservantes			
1	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM		Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,13 %	m-cresol al 0,12 %
2	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM	Metionina 20 mM	F68 al 0,05 %	Fenol al 0,13 %	m-cresol al 0,12 %	
3	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM	Metionina 20 mM	F68 al 0,1 %	Fenol al 0,13 %	m-cresol al 0,12 %	
4	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,12 %	
5	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM	Metionina 20 mM	F68 al 0,05 %	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,12 %	
6	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM	Metionina 20 mM	F68 al 0,1 %	Fenol al 0,15 %	m-cresol al 0,12 %	
7	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %	
8	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 20 mM	10 mg/ml HA	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
9	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM	10 mg/ml HA	Metionina 20 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
10	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM		Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %
11	7,4	Tris/HCl 30 mM	NaCl 80 mM	Glicerina 50 mM	10 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,1 %	m-cresol al 0,15 %

Se almacenó un (1) ml de cada formulación en viales de vidrio de 2 ml de borosilicato de tipo 1 USP con un tapón de goma de clorobutilo y un sello de aluminio. Cada formulación se incubó, individualmente, a 30 ± 2 °C y 37 ± 2 °C y las mediciones de estabilidad se registraron a en el instante $t = 0, 2, 4, 7$ y 9 días, 2 semanas, 1 mes o 1,5 meses. Para cada formulación, se sometió un conjunto de viales a agitación usando un agitador Titer Plate (LabLine) a 600 rpm durante 9 días a 25 °C. También se sometió a NovoLog® (insulina Aspart) a las mismas condiciones de agitación como control.

La estabilidad se evaluó midiendo el pH, la apariencia, osmolalidad, la actividad enzimática de rHuPH20, el contenido de rHuPH20 mediante RP-HPLC y el contenido de insulina mediante RP-HPLC (véanse los ejemplos 2-5 y

12). Los criterios aceptables o la especificación diana para los parámetros de estabilidad fueron los mismos que los expuestos en el ejemplo 12.

1. 30 °C

5 Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras y no contenían partículas tras 2 semanas a 30 °C. Todas las formulaciones ensayadas fueron estables a 30 °C hasta el instante de 2 semanas tanto para rHuPH20 como para insulina Aspart, observándose una tendencia ligeramente negativa para todas las formulaciones a lo largo del tiempo. Se observó un efecto estabilizante en la actividad de rHuPH20 para las formulaciones que contenían oligómeros de HA (n.º 8, n.º 9, n.º 11) tal como se hizo evidente por la mayor actividad enzimática y contenido en comparación con las formulaciones que no contenían oligómeros de HA. Además, una reducción en las concentraciones de glicerina y metionina no dio como resultado un efecto visible en la estabilidad de estas formulaciones (n.º 8, n.º 9, y n.º 11).

15 Una comparación de las concentraciones de conservante indicó que reducir la cantidad de metacresol y un aumento modesto en la cantidad de fenol es beneficioso para la estabilidad de rHuPH20, pero el beneficio se elimina cuando la concentración de fenol es alta. Por el contrario, los cambios en las concentraciones de conservante tuvieron poco efecto en la estabilidad de la insulina Aspart, ya que se observó una reducción modesta en el contenido de insulina Aspart para todas las formulaciones. Por ejemplo, rHuPH20 fue más estable en las formulaciones que contenían fenol al 0,13 % (n.º 1-n.º 3) que aquellas que contenían fenol al 0,15 % (n.º 4-n.º 6). Las formulaciones que contenían concentraciones de fenol aumentadas y concentraciones de metacresol reducidas (n.º 1-n.º 3) fueron más estables que la formulación de referencia (n.º 7) que contenía una menor cantidad de fenol y una mayor cantidad de metacresol. Por el contrario, las formulaciones n.º 4-n.º 6 fueron tan estables como la formulación de referencia n.º 7.

2. 37 °C

30 Todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras y no contuvieron partículas tras 9 días a 37 °C. Se observó un efecto estabilizante en la actividad de rHuPH20 para las formulaciones que contenían oligómeros de HA (n.º 8, n.º 9, y n.º 11) tal como se hizo evidente por la mayor actividad enzimática y contenido tras 2 días a 37 °C en comparación con las formulaciones que no contenían oligómeros de HA, aunque ninguna de las formulaciones tuvo un nivel aceptable de actividad enzimática de rHuPH20. La pérdida de actividad enzimática de rHuPH20 se asoció con la pérdida de contenido de rHuPH20. Por el contrario, el contenido de insulina Aspart mostró una tendencia negativa para las formulaciones que contenían oligómeros de HA, lo que indica que la insulina Aspart no es tan estable a 37 °C en presencia de oligómeros de HA.

35 De manera similar a los efectos observados a 25 °C, una comparación de las concentraciones de conservante indicó que reducir la cantidad de metacresol y un aumento modesto en la cantidad de fenol es beneficioso para la estabilidad de rHuPH20, pero el beneficio se elimina cuando la concentración de fenol es alta. Por el contrario, los cambios en las concentraciones de conservante tuvieron poco efecto en la estabilidad de la insulina Aspart, ya que se observó una reducción modesta en el contenido de insulina para todas las formulaciones.

3. Agitación a 25 °C

45 rHuPH20 e insulina Aspart fueron estables en todas las formulaciones tras 24 o 48 horas a 25 °C con agitación, aunque las formulaciones que contenían oligómeros de HA (n.º 8, n.º 9, y n.º 11) estaban nubladas tras 24 horas. Novolog® fue estable tras 24 horas a 25 °C con agitación. Los cambios en las concentraciones de conservante no tuvieron efecto en la estabilidad de rHuPH20 o de insulina Aspart.

Ejemplo 17

Formulaciones que contienen oligómeros de HA e ión metálico divalente (Mg²⁺)

55 En este ejemplo, se evaluó el efecto de niveles EP-B de conservantes en la actividad enzimática de rHuPH20 en dos condiciones de almacenamiento: 5 días a 5 °C y 37 °C durante 3-5 días. Las formulaciones contenían diferentes cantidades de oligómeros de HA y de ión metálico divalente (Mg²⁺).

60 Las formulaciones de rHuPH20 se exponen en la tabla 71 a continuación. Las formulaciones básicas contenían 600 U/ml de rHuPH20, Tris/HCl 30 mM, NaCl 200 mM, metionina 5 mM, poloxamer 188 al 0,01 % (Poloxamer 188) con fenol al 0,100 % y m-cresol al 0,150 % a pH 6,8. Las formulaciones 2 y 4 contenían además 10 mg/ml de oligómeros de HA y las formulaciones 3 y 5 contenían 20 mg/ml de oligómeros de HA. Las formulaciones 2 y 3 contenían además Mg²⁺ 3 mM y las formulaciones 4 y 5 contenían Mg²⁺ 10 mM.

Tabla 71. Formulaciones que contienen 600 U/ml de rHuPH20

n.º	pH	Tampón	Modificador de la tonicidad	Estabilizante			Ion metálico	Conservantes	
1	6,8	Tris/HCl 30 mM	NaCl 200 mM	---	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	---	Fenol al 0,100 %	m-cresol al 0,150 %
2	6,8	Tris/HCl 30 mM	NaCl 200 mM	10 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Mg ²⁺ 3 mM	Fenol al 0,100 %	m-cresol al 0,150 %
3	6,8	Tris/HCl 30 mM	NaCl 200 mM	20 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Mg ²⁺ 3 mM	Fenol al 0,100 %	m-cresol al 0,150 %
4	6,8	Tris/HCl 30 mM	NaCl 200 mM	10 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Mg ²⁺ 10 mM	Fenol al 0,100 %	m-cresol al 0,150 %
5	6,8	Tris/HCl 30 mM	NaCl 200 mM	20 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Mg ²⁺ 10 mM	Fenol al 0,100 %	m-cresol al 0,150 %

Se almacenó un (1) ml de cada formulación en viales de vidrio de 2 ml de borosilicato de tipo 1 USP con un tapón de goma de clorobutilo y un sello de aluminio. Cada formulación se incubó, individualmente, a 5 y 37 °C y las mediciones de estabilidad se registraron a en el instante t = 3, 4 y/o 5 días. La estabilidad se evaluó midiendo el pH, la apariencia, osmolaridad, actividad enzimática de rHuPH20 y contenido de rHuPH20 mediante RP-HPLC (véanse los ejemplos 2-3 y 5 y el ejemplo 12). Los criterios de aceptación o la especificación diana para cada uno de los parámetros anteriores son los mismos a los expuestos en el ejemplo 12.

- 10 Los resultados demuestran que todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas. La osmolaridad tendió a aumentar con la adición de Mg²⁺. La actividad enzimática y el contenido de rHuPH20 fue estable a 5 °C para todas las formulaciones. A 37 °C, La actividad enzimática de rHuPH20 se redujo a los 3 días y tras 4 días, se encontró en la especificación diana aceptada de 375 U/ml. Después de 5 días, permanecía aproximadamente la mitad de la actividad enzimática inicial de rHuPH20. La caída en la actividad se correlacionó con la caída en el contenido de rHuPH20.

Ejemplo 18

Estudio de formulaciones de conservante USP a 5 °C o 37 °C

- 20 En este ejemplo, se evaluó el efecto de niveles USP de conservantes en la actividad enzimática de rHuPH20 en dos condiciones de almacenamiento: 4 días a 5 °C y 37 °C durante 2, 4, 6, 8 y 12 días. Las formulaciones contenían diferentes cantidades de oligómeros de HA y sal a diversos pH. Las formulaciones de rHuPH20 se exponen en la tabla 72 a continuación. Las formulaciones básicas contenían 600 U/ml de rHuPH20, 3,5 mg/ml de insulina aspart, insulina lispro o insulina regular, Tris/HCl 30 mM, metionina 5 mM, poloxamer 188 al 0,01 % (Poloxamer 188) con fenol al 0,125 % y m-cresol al 0,075 %. La formulación 1 no contenía insulina. Las formulaciones 2-5 contenían insulina aspart, las formulaciones 6-9 contenían insulina regular y las formulaciones 10-13 contenían insulina lispro. Se prepararon cuatro formulaciones básicas para cada análogo de insulina. Las formulaciones 2, 6 y 10 fueron iguales a las 3, 7 y 11, respectivamente, con diversos pH (7,0 frente a 7,2). Las formulaciones 3, 8 y 12 fueron iguales a las 4, 9 y 13, respectivamente, con diversas cantidades de NaCl. Estas formulaciones contenían adicionalmente 10 mg/ml de oligómeros de HA.

Tabla 72. Formulaciones

n.º	PH	Tampón	Modificador de la tonicidad	Estabilizante		F68 al 0,01 %	Conservantes		rHuPH20	insulina
							Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %		
1	7,0	Tris/HCl 30 mM	NaCl 200 mM	—	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	—
2	7,0	Tris/HCl 30 mM	NaCl 140 mM	—	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de Aspart
3	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 140 mM	—	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de Aspart
4	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 140 mM	10 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de Aspart
5	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 100 mM	10 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de Aspart
6	7,0	Tris/HCl 30 mM	NaCl 140 mM	—	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de insulina
7	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 140 mM	—	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de insulina
8	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 140 mM	10 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de insulina
9	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 100 mM	10 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de insulina
10	7,0	Tris/HCl 30 mM	NaCl 140 mM	—	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de Lispro
11	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 140 mM	—	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de Lispro
12	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 140 mM	10 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de Lispro
13	7,2	Tris/HCl 30 mM	NaCl 100 mM	10 mg/ml HA	Metionina 5 mM	F68 al 0,01 %	Fenol al 0,125 %	m-cresol al 0,075 %	600 U/ml	3,5 mg/ml de Lispro

Se almacenó un (1) ml de cada formulación en viales de vidrio de 2 ml de borosilicato de tipo 1 USP con un tapón de goma de clorobutilo y un sello de aluminio. Cada formulación se incubó, individualmente, a 5 y 37 °C y las mediciones de estabilidad se registraron a en el instante t = 2, 4, 6, 8 y/o 12 días. La estabilidad se evaluó midiendo el pH, la apariencia, osmolalidad, la actividad enzimática de rHuPH20, el contenido de rHuPH20 mediante RP-HPLC y el contenido de insulina mediante RP-HPLC (véanse los ejemplos 2-3, 5 y 12). Los criterios de aceptación y la especificación diana para estabilidad en cada uno de los parámetros ensayados fueron los mismos a los expuestos en el ejemplo 12.

Los resultados muestran que la formulación 1 y todas las formulaciones de insulina aspart (n.º 2-5) fueron transparentes e incoloras sin partículas tras 12 días a 5 o 37 °C. Se observaron cristales en las formulaciones 6 y 8-9 y 11-13 tras 6 días a 5 °C y se observaron cristales en la formulación 10 tras solo 2 días a 5 °C.

Todas las formulaciones fueron estables tras 4 días a 5 °C. Las formulaciones de insulina lispro (n.º 10-13) fueron estables durante 8 días a 37 °C mientras que las formulaciones de insulina (n.º 6-9) fueron estables durante solo 2 días (con la excepción de la n.º 7) a 37 °C. Las formulaciones de insulina aspart (n.º 2-5) fueron estables durante 4-6 días a 37 °C. El contenido de rHuPH20 se redujo a lo largo del tiempo para todas las formulaciones a 37 °C. El contenido de insulina se redujo a lo largo del tiempo para todas las formulaciones.

Ejemplo 19

Pruebas de eficacia antimicrobiana de diferentes niveles de conservante

En este ejemplo, se prepararon varios lotes de formulaciones que contenían diferentes niveles de conservantes con cantidades diana de insulina y rHuPH20 para las pruebas de eficacia microbiana. Las pruebas se llevaron a cabo por encargo de acuerdo con la orientación de EP y USP por un laboratorio analítico (Quadrants Scientific, Inc., San Diego, CA y Lancaster Laboratories, Lancaster, PA). Las diversas formulaciones que contenían conservante se ensayaron respecto de su eficacia antimicrobiana las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus* y los hongos *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Las pruebas se llevaron a cabo 1) añadiendo un inóculo inicial (al menos 10⁵ UFC/ml) de cada bacteria a la muestra y 2) midiendo las UFC/ml de cada bacteria u hongo a las 24 horas, 7 días y 14 días. Los datos en bruto (UFC/ml) se convirtieron a reducción de unidades log 10 a partir del inóculo medido. Las formulaciones se ensayaron a una temperatura de 37 °C.

Todas las formulaciones contenían 100 U/ml de insulina o análogo de insulina y 5 µg/ml de rHuPH20. Los componentes restantes variaron entre las formulaciones, de tal forma que pudo compararse el efecto de diversos componentes. Los resultados se resumen en la tabla 73, que resume los efectos de los diversos componentes de la formulación en la eficacia antimicrobiana. Un efecto neutro indica que el componente indicado y sus concentraciones no tienen efecto en la eficacia antimicrobiana. Por ejemplo, el análogo de insulina tiene un efecto neutro en la eficacia antimicrobiana, cuando se comparan dos formulaciones que varían únicamente en el análogo de insulina, es decir, insulina aspart o insulina lispro. La concentración de NaCl tuvo bien un efecto neutro o negativo en la eficacia antimicrobiana, dependiendo de las formulaciones.

Tabla 73. Resumen de las pruebas de eficacia antimicrobiana		
	Concentración	Efecto
Insulina frente a análogo		Datos insuficientes
Aspart frente a Lispro		Neutro
pH	(7,2 - 7,4)	Neutro
Metionina	(50 - 100 mM)	Neutro
	(20 - 50 mM)	Datos insuficientes
NaCl	(50 - 100 mM)	Negativo
	(50 - 100 mM)	Neutro
	(80 - 100 mM)	Neutro
F68	(0,01 - 0,03 %)	Neutro
	(0,01 - 0,03 %)	Ligeramente negativo
Glicerol	(0 - 50 mM)	Datos insuficientes
Compañía	(Quadrant frente a Lancaster)	Neutro

Ejemplo 20

Generación de una línea celular que expresa rHuPH20 soluble

Se usó el plásmido HZ24 (expuesto en la SEQ ID NO: 52) se usó para transfectar células de ovario de hámster chino (CHO) (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 7.76.429 y 7.781.607 y la Publicación de Estados Unidos n.º 2006-0104968). El vector de plásmido HZ24 para la expresión de rHuPH20 soluble contiene un armazón de vector pCI (Promega), ADN que codifica los aminoácidos 1-482 de hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO: 49),

un sitio de entrada a ribosoma interno (IRES) del virus ECMV (Clontech), y el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón. El armazón de vector pCI también incluye ADN que codifica el gen de resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un origen de replicación fl, una región potenciadora/promotora inmediata-temprana de citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico, y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica la construcción de rHuPH20 soluble contiene un sitio de NheI y una secuencia consenso Kozak antes del ADN que codifica la metionina en la posición de aminoácido 1 de la secuencia de señal nativa de 35 aminoácidos de PH20 humana, y un codón de parada después del ADN que codifica la tirosina correspondiente a la posición de aminoácidos 482 de la hialuronidasa PH20 humana expuesta en la SEQ ID NO: 1, seguido del sitio de restricción de BamHI. La construcción pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por lo tanto, da como resultado una sola especie de ARNm dirigida por el promotor CMV que codifica los aminoácidos 1-482 de PH20 humana (expuesta en la SEQ ID NO: 3) y los aminoácidos 1-186 de la dihidrofolato reductasa de ratón (expuesta en la SEQ ID NO: 53), separadas por el sitio de entrada ribosomal interno (IRES).

Las células CHO DG44 que crecen en medio CD-CHO modificado de GIBCO para células DHFR(-), suplementado con glutamina 4 mM y 18ml/l de Plurionic F68/l (Gibco), se sembraron a $0,5 \times 10^6$ células/ml en un matraz de agitación en preparación para la transfección. Las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 % en un incubador humidificado, agitando a 120 rpm. Se ensayó la viabilidad de las células CHO DG44 no transfectadas en crecimiento exponencial antes de la transfección.

Se precipitaron sesenta millones de células viables del cultivo celular de CHO DG44 no transfectadas y se resuspendieron a una densidad de 2×10^7 células en 0,7 ml de tampón de transfección 2x (HeBS 2x: 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 mg) del plásmido HZ24 lineal (linealizado mediante digestión durante toda la noche con Cla I (New England Biolabs), y se transfirieron las soluciones de células/ADN en cubetas de electroporación gap BTX (Gentronics) de 0,4 cm a temperatura ambiente. Se llevó a cabo una electroporación de control negativo sin ADN de plásmido mezclado con las células. Las mezclas de células/plásmido se electroporaron con una descarga del capacitor de 330 V y 960 µF.

Las células se retiraron de las cubetas después de la electroporación y se transfirieron en 5 ml de medio CD-CHO modificado para células DHFR(-), suplementado con glutamina 4 mM y 18ml/l de Plurionic 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 un incubador humidificado.

Dos días después de la electroporación, se retiraron 0,5 ml de medio de cultivo tisular de cada pocillo y se ensayaron respecto de la presencia de actividad de hialuronidasa, usando el ensayo de microturbidez descrito en el ejemplo 2.

Tabla 74: Actividad inicial de hialuronidasa de células CHO DG44 transfectadas con HZ24 a las 40 horas después de la transfección

	Dilución	Actividad (Unidades/ml)
Transfección 1 330V	1 a 10	0,25
Transfección 2 350V	1 a 10	0,52
Control negativo	1 a 10	0,015

Se recogieron las células de la transfección 2 (350V) del pocillo de cultivo tisular, se contaron y se diluyeron a 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 medio CD-CHO (GIBCO) que contenía suplemento GlutaMAX™-1 4 mM (GIBCO™, Invitrogen Corporation) y sin suplementos de hipoxantina y timidina a los pocillos que contenían células (volumen final de 0,2 ml).

Se identificaron diez clones de las 5 placas cultivadas sin metotrexato.

Tabla 75. Actividad de hialuronidasa de clones identificados

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

Se expandieron seis clones de HZ24 en cultivo y se transfirieron a matraces de agitación en forma de suspensiones de células individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11, y 4D10 se emplacaron en placas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos usando una estrategia de dilución infinita bidimensional en la que las células se diluyeron a 1:2 en vertical en la placa, y a 1:3 en horizontal en la placa, comenzando a 5000 células en el pocillo superior izquierdo. Los clones diluidos se cultivaron 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 una 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 T-25. Los clones aislados del protocolo de tratamiento de metotrexato se expandieron en presencia de metotrexato 50 nM. El clon 3D35M se expandió adicionalmente en metotrexato 500 nM, dando lugar a clones que producían un exceso de 1.000 Unidades/ml en matraces de agitación (clon 3D35M; o Gen1 3D35M). Entonces se preparó un banco maestro de células (MCB) de las células 3D35M.

Ejemplo 21

Producción de células Gen2 que contienen PH20 humano soluble (rHuPH20)

Se adaptó la línea celular Gen1 3D35M descrita en el ejemplo 20 a mayores niveles de metotrexato para producir clones de generación 2 (Gen2). Las 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 mayor nivel de metotrexato cultivándolas y pasándolas 9 veces a lo largo de un periodo de 46 días en un incubador a 37 °C, humidificado con CO₂ al 7 %. La población de células amplificada 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 expansión. Las células 3E10B se cultivaron en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 2,0 µM durante 20 pases. Se creó un banco maestro de células (MCB) de la línea celular 3E10B y se congeló y usó para estudios posteriores.

La amplificación de la línea celular continuó cultivando células 3E10B en medio CD CHO que contenía GlutaMAX-1™ 4 mM y metotrexato 4,0 µM. Tras el 12º pase, las células se congelaron en viales como banco celular de investigación (RCB). Un vial del RCB se descongeló y se cultivó en medio que contenía metotrexato 8,0 µM. Después de 5 días, la concentración de metotrexato en el medio se aumentó a 16,0 µM, después a 20,0 µM 18 días después. Las células del 8º pase en el 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™ 4,0 mM y metotrexato 20,0 µM. Los clones se identificaron 5-6 semanas después y se seleccionó el clon 2B2 para su expansión en medio que contenía metotrexato 20,0 µM. Después del 11º pase, las células 2B2 se congelaron en viales como banco celular de investigación (RCB).

Las células 2B2 son células CHO DG44 deficientes para dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20). La PH20 soluble está presente en células 2B2 a un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. Los análisis de transferencia de Southern de ADN genómico de células 2B2 digerido con Spe I, Xba I, BamH I/Hind III usando 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 menores de hibridación (-13,9, -6,6, -5,7 y -4,6 kb) con ADN digerido con Spe I; una banda de hibridación principal de -5,0 kb y dos bandas de hibridación menores (-13,9 y -6,5 kb) con ADN digerido con Xba I; y una sola banda de hibridación de -1,4 kb observada usando ADN de 2B2 digerido con BamH I/Hind III. El análisis de secuencia del transcrito de ARNm indicó que el ADNc derivado (SEQ ID NO: 56) fue idéntico a la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 49) excepto por una diferencia de 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 silente, sin efecto en la secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 22

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

Se descongeló un vial de HZ24-2B2 y se expandió a partir de matraces de agitación mediante matraces de agitación de 36 l en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con metotrexato 20 µM y GlutaMAX-1™ (Invitrogen). En resumen, el vial de células se descongeló en un baño de agua a 37 °C, se añadió medio y se centrifugaron las células. Las células se resuspendieron en un matraz de agitación de 125 ml con 20 ml de medio reciente y se colocaron en un incubador a 37 °C, con CO₂ al 7 %. Las células se expandieron hasta 40 ml en el matraz de agitación de 125 ml. Cuando la densidad celular alcanzó más de 1,5 x 10⁶ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 125 ml en un volumen de cultivo de 100 ml. El matraz se incubó a 37 °C, CO₂ al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de 1,5 x 10⁶ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 250 ml en un volumen de cultivo de 200 ml, y el matraz se incubó a 37 °C, CO₂ al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de 1,5 x 10⁶ células/ml, el cultivo se expandió en un matraz de agitación de 1 l en un

volumen de cultivo de 800 ml y se incubó a 37 °C, CO₂ al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de 1,5 x 10⁶ células/ml se expandió el cultivo en un matraz de agitación de 6 l en un volumen de cultivo de 5000 ml y se incubó a 37 °C, CO₂ al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó más de 1,5 x 10⁶ células/ml se expandió el cultivo en un matraz de agitación de 36 l en un volumen de cultivo de 32 l y se incubó a 37 °C, CO₂ al 7 %.

5 Se esterilizó un reactor de 400 l y se añadieron 230 ml de medio CD-CHO. Antes de su uso, se comprobó si el reactor estaba contaminado. Se transfirieron aproximadamente 30 l de células a partir de los matraces de agitación de 36 l al biorreactor de 400 l (Braun) a una densidad de inoculación de 4,0 x 10⁵ células viables por ml y un volumen total de 260 l. Los parámetros fueron: punto de temperatura ajustado, 37 °C; Velocidad del impulsor 40-55
10 RPM; Presión del vaso: 20,68 kPa (3 psi); Burbujeo de aire 0,5 - 1,5 l/min; Capa de aire: 3 l/min. Se tomaron muestras diarias del reactor para los recuentos celulares, verificación del pH, análisis del medio, producción de proteínas y retención. Asimismo, durante el ciclo se añadieron alimentaciones de nutrientes. A las 120 horas (día 5), se añadieron 10,4 l de medio de alimentación n.º 1 (4x CD-CHO + 33 g/l de glucosa + 160 ml/l de Glutamax-1™ + 83
15 ml/l Yeastolate + 33 mg/l de rHuInsulina). A las 168 horas (día 7), se añadieron 10,8 l de alimentación n.º 2 (2x CD-CHO + 33 g/l de glucosa + 80 ml/l de Glutamax-1™ + 167 ml/l Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio), y se cambió la temperatura de cultivo a 36,5 °C. A las 216 horas (día 9), se añadieron 10,8 l de alimentación n.º 3 (1 x CD-CHO + 50 g/l de glucosa + 50 ml/l de Glutamax-1™ + 250 ml/l Yeastolate + 1,80 g/l de butirato de sodio), y se cambió la temperatura de cultivo a 36 °C. A las 264 horas (día 11), se añadieron 10,8 l de alimentación n.º 4 (1 x CD-
20 CHO + 33 g/l de glucosa + 33 ml/l de Glutamax-1™ + 250 ml/l Yeastolate + 0,92 g/l de butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 35,5 °C. Se observó que la adición del medio de alimentación potenciaba dramáticamente la producción de rHuPH20 soluble en los estadios finales de producción. El reactor se recogió a los 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células se redujo por debajo del 40 %. El proceso dio como resultado una productividad final de 17.000 Unidades por ml con una densidad celular máxima de 12 millones de células/ml. En el momento de la recogida, se muestreó el cultivo respecto de micoplasma, carga biológica, endotoxinas y virus *in vitro*
25 e *in vivo*, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y actividad enzimática.

El cultivo se bombeó mediante una bomba peristáltica a través de cuatro módulos del sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, conteniendo cada uno una capa de tierra de diatomeas graduada a 4-8 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a 1,4-1,1 µm, seguido de una membrana de nitrocelulosa, después a través de un solo sistema de filtración Millistak (Millipore) que contenía una capa de tierra de diatomeas graduada a 0,4-0,11 µm y una capa de tierra de diatomeas graduada a <0,1 µm, seguido de una membrana de nitrocelulosa, y después a través de un filtro final de 0,22 µm en una bolsa estéril de un solo uso con una capacidad de 350 l. El fluido de cultivo celular recogido se suplementó con EDTA 10 mM y Tris 10 mM a un pH de 7,5. El cultivo se concentró 10x con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) usando cuatro Sartoslice TFF de corte de peso molecular de 30 kDa (MWCO)
35 con filtro de poliéter sulfona (PES) (Sartorius), seguido de un intercambio de tampón 10x con Tris 10 mM, Na₂SO₄ 20 mM, pH 7,5 en un filtro final de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 50 l.

La parte recogida concentrada y diafiltrada se inactivó respecto de virus. Antes de la inactivación viral, se preparó una solución de Triton X-100 al 10 %, fosfato de tri(n-butilo) (TNBP) al 3 %. La parte recogida concentrada y diafiltrada se expuso a Triton X-100 al 1 %, TNBP al 0,3 % durante 1 hora en un vaso de reacción de vidrio de 35 l inmediatamente antes de la purificación en la columna Q.

B. Purificación de rHuPH20 soluble de Gen2

45 Se preparó una columna de intercambio iónico Q Sefarosa (Pharmacia) (9 l de resina, A= 29 cm, D= 20 cm). Las muestras lavadas se recogieron para un ensayo de determinación del pH, conductividad y 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 vírica, la parte recogida concentrada diafiltrada 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,
50 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 en una bolsa estéril. La muestra de eluido se ensayó respecto de carga biológica, concentración de proteína y actividad de hialuronidasa. Se tomaron lecturas de absorbancia de A₂₈₀ al comienzo y al final del intercambio.

A continuación se llevó a cabo cromatografía de intercambio hidrófobo de fenil-sefarosa (Pharmacia). Se preparó una columna de fenil-sefarosa (PS) (19-21 l de resina, A = 29 cm, D = 30 cm). El lavado se recogió y se muestreó respecto del pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. El eluido de proteína de la columna de sefarosa Q se suplementó con soluciones madre de sulfato de amonio 2 M, fosfato potásico 1 M y CaCl₂ 1 M para dar 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 pasante de la columna. La columna se lavó con fosfato potásico 5 mM,
60 sulfato de amonio 0,5 M y CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0 a 100 cm/h y se añadió el lavado al flujo pasante recogido. En combinación con el lavado de columna, el flujo pasante se hizo pasar a través de un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril. Se muestreó el flujo pasante respecto de su carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

65

5 Se preparó una columna de boronato de aminofenilo (ProMedics). El lavado se recogió y se muestreó respecto del pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato potásico 5 mM, sulfato de amonio 0,5 M. El flujo pasante de PS que contenía proteína purificada se cargó en la columna de boronato de aminofenilo a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con fosfato potásico 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 hizo pasar a través de un filtro estéril dentro de una bolsa estéril. La muestra eluida se ensayó respecto de carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

10 Se preparó una columna de hidroxiapatita (HAP) (Biorad). El lavado se recogió y se ensayó respecto del pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con fosfato potásico 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,0. La proteína purificada con boronato de aminofenilo se suplementó a concentraciones finales de fosfato potásico 5 mM y CaCl₂ 0,1 mM y se cargó en la columna HAP a un caudal de 100 cm/h. La columna se lavó con fosfato potásico 5 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La columna se lavó seguidamente con fosfato potásico 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La proteína se eluyó con fosfato potásico 70 mM, pH 7,0 y se hizo pasar a través de un filtro estéril de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril. La muestra eluida se ensayó respecto de carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

20 Entonces se hizo pasar la proteína purificada con HAP a través de un filtro de eliminación vírica. En primer lugar se preparó el filtro Viosart (Sartorius) esterilizado lavándolo con 2 L de fosfato potásico 70 mM, pH 7,0. Antes de su uso, se muestreó el tampón filtrado respecto del pH y la conductividad. La proteína purificada con HAP se bombeó mediante una bomba peristáltica a través del filtro de eliminación vírica de 20 nM. La proteína filtrada en fosfato potásico 70 mM, pH 7,0 se hizo pasar a través de un filtro final de 0,22 µm dentro de una bolsa estéril. La muestra filtrada para virus se ensayó respecto de la concentración de proteína, actividad enzimática, oligosacáridos, monosacáridos y perfil de ácido siálico. También se ensayó la muestra respecto de impurezas relacionadas con el proceso.

30 La proteína en el filtrado se concentró entonces a 10 mg/ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocon Slice de corte de peso molecular de 10 kD (Sartorius). El filtro se preparó en primer lugar lavándolo con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0 y se muestreó el permeado respecto del pH y la conductividad. Después de concentración, se muestreó la proteína concentrada y se ensayó respecto de concentración de proteína y actividad enzimática. Se efectuó un intercambio de factor 6x en la proteína concentrada en el tampón final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6,0. Después del intercambio del tampón, la proteína concentrada se hizo pasar a través de un filtro de 0,22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 l. La proteína se muestreó y ensayó respecto de la concentración de proteína, actividad enzimática, grupos sulfhidrilo libres, perfil de oligosacáridos y osmolalidad.

35 La proteína en bruto esterilizada por filtración se dispensó de manera aséptica a 20 ml en viales de teflón estériles de 30 ml (Nalgene). Entonces los viales se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -20 ± 5 °C.

40 **Ejemplo 23**

Efecto de la lisil lisina como estabilizante para rHuPH20

45 La lisil lisina (Lys-Lys o dilisina) se ensayó respecto de su capacidad para estabilizar a rHuPH20 a temperaturas elevadas. Se prepararon ocho formulaciones tal como se describe en la tabla 76 a continuación. Como control, se ensayó Hylenex™ (que contenía 167 U/ml de rHuPH20, Na₂PO₄ 12,5 mM, NaCl 145 mM, HSA 1 mg/ml, CaCl₂ 2,7 mM, EDTA al 0,1 %, pH 7.4; denominada F1). Las formulaciones restantes se generaron para contener 170 U/ml de rHuPH20, Tween 80 al 0,01 % y diversos excipientes/estabilizantes tal como se expone en la tabla 76. A cada formulación ensayada, se añadió diclorhidrato de Lys-Lys (H-Lys-Lys-OH HCl; RnD Chem n.º G-2675) a una concentración de 50, 100 o 150 mM. Ya que se usó Lys-Lys en forma de una sal de cloruro, la osmolalidad varió entre las composiciones, tal como se observa en la tabla 76 a continuación.

55 Todas las formulaciones se filtraron dentro de viales de vidrio de borosilicato USP de tipo 1 de 2 ml con tapones de goma de 13 mm 4432/50 y se sellaron con sellos de aluminio. Los viales se incubaron a tres temperaturas diferentes, 5 °C, 25 °C y 40 °C durante hasta 3 meses. Las muestras se ensayaron a tiempo 0, 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses y 3 meses, dependiendo de la temperatura (véanse las tablas 77-79). En cada punto de ensayo, se retiraron muestras de los incubadores y se ensayaron respecto de la actividad de hialuronidasa tal como se describe en el ejemplo 2.

Form.	PH20 U/ml	NaCl mM	Na ₂ PO ₄ mM	Lys-Lys-2 HCl mM	TW80 %	Metionina mM	pH	mOsm
F1 Hylenex™	167 U/ml de PH20, Na ₂ PO ₄ 12,5 mM, NaCl 145 mM, HSA 1 mg/ml, CaCl ₂ 2,7 mM, 0,1 % EDTA pH 7.4							NA
F2	170	150	12,5	ninguno	0,01	10	7,0	316

Tabla 76. Formulaciones

Form.	PH20 U/ml	NaCl mM	Na ₂ PO ₄ mM	Lys-Lys-2 HCl mM	TW80 %	Metionina mM	pH	mOsm
F3	170	100	12,5	50	0,01	10	7,0	364
F4	170	50	12,5	100	0,01	10	7,0	419
F5	170	NA	NA	100	0,01	10	7,0	444
F6	170	NA	NA	150	0,01	10	6,5	446
F7	170	NA	NA	150	0,01	ninguno	7,0	449
F8	170	NA	NA	100	0,01	10	7,0	300

5 Los resultados se muestran en las tablas 77-79 a continuación, que exponen la actividad de hialuronidasa en U/ml. Para las muestras almacenadas a 5 °C o 25 °C, se observaron pequeñas disminuciones en la actividad de rHuPH20, pero todas las muestras mantuvieron una actividad de hialuronidasa de al menos 135 U/ml (tablas 77 y 78). Además, no se observaron diferencias significativas en la actividad de hialuronidasa entre las composiciones que contenían Lys-Lys y las composiciones que no contenían Lys-Lys. Para las muestras almacenadas a 40 °C, todas las muestras tuvieron una actividad enzimática reducida con el tiempo. Las formulaciones F1 y F2 que no contenían Lys-Lys tenían la mayor disminución en la actividad de hialuronidasa. Tras 2 semanas a 40 °C, la actividad de las formulaciones F1 y F2 fue menor de 135 U/ml. Las formulaciones que contenían Lys-Lys, a cualquier concentración, mantenían toda su actividad por encima de 135 U/ml durante al menos 1 mes a 40 °C.

Tabla 77. Actividad de hialuronidasa (U/ml) de rHuPH20 a 5 °C

Form.	Tiempo de incubación, Meses			
	0	1	2	3
F1	172	169	168	160
F2	170	162	162	150
F3	169	163	161	153
F4	165	158	158	152
F5	161	156	160	148
F6	170	163	164	157
F7	163	161	159	149
F8	177	174	169	161

Tabla 78. Actividad de hialuronidasa (U/ml) de rHuPH20 a 25 °C

Form.	Tiempo de incubación, Meses				
	0	0,5	1	2	3
F1	172	176	168	157	161
F2	170	170	162	144	145
F3	169	162	162	151	152
F4	165	165	161	150	147
F5	161	161	162	160	159
F6	170	175	169	169	164
F7	163	159	155	152	156
F8	177	174	170	167	165

Tabla 79. Actividad de hialuronidasa (U/ml) de rHuPH20 a 40 °C

Form.	Tiempo de incubación, Meses					
	0	0,25	0,5	1	2	3
F1	172	137	127	85	46	33
F2	170	133	114	98	63	53
F3	169	162	158	141	113	100
F4	165	160	155	138	110	96
F5	161	160	156	139	125	126
F6	170	167	162	158	141	137
F7	163	157	152	139	121	113
F8	177	171	170	149	117	128

15 Ejemplo 24**Efecto de bajas concentraciones de lisil lisina en la estabilidad de rHuPH20**

Se ensayaron diversas formulaciones de rHuPH20 respecto de los efectos de bajas concentraciones de lisil lisina y pH en la actividad de rHuPH20 a temperaturas elevadas. Se evaluaron tres concentraciones diferentes de Lys-Lys (10, 30 y 50 mM) y tres pH diferentes (6,5, 7,0 y 7,5), generando un total de 9 muestras. Las formulaciones ensayadas se exponen en la tabla 80 a continuación. Como control, se ensayó Hylenex™ (expuesto en el ejemplo 23; F1). Las formulaciones F2 a F10 se generaron todas a una diana aproximada de 160 U/ml de rHuPH20, L-metionina 10 mM (Spectrum n.º M1441), y polisorbato 80 al 0,01 % (Baker n.º 4117-04) y diversas cantidades de H-Lys-Lys-OH HCl (RnD Chem n.º G-2675) y NaCl (Baker n.º 3628). Se usó NaOH 1N (EMD n.º SX0607H-6) para ajustar el pH. La concentración de NaCl se ajustó de tal forma que todas las formulaciones tenían aproximadamente la misma osmolalidad (300 mOsm/kg). Todas las formulaciones se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros.

Todas las formulaciones se filtraron a 0,5 ml por vial dentro de viales de vidrio de borosilicato USP de tipo 1 de 2 ml con tapones de goma de 13 mm 4432/50 y se sellaron con sellos de aluminio. Los viales se incubaron a 40 °C durante hasta 8 semanas. Las muestras se ensayaron a tiempo 0, y 1, 2, 3, 4, y 8 semanas. En cada punto de ensayo, se retiraron muestras de los incubadores y se ensayaron respecto de la actividad de hialuronidasa tal como se describe en el ejemplo 2.

Tabla 80. Formulaciones

Form.	Lys-Lys mM	Met mM	NaCl mM	PS80 %	pH	Osmolalidad mOsm/kg
F1 Hylenex™	167 U/ml de PH20, Na ₂ PO ₄ 12,5 mM, NaCl 145 mM, HSA 1 mg/ml, CaCl ₂ 2,7 mM, EDTA al 0,1 %, pH 7.4				7,40	ND
F2	50	10	97	0,01	7,01	302
F3	30	10	117	0,01	7,51	305
F4	50	10	99	0,01	6,54	304
F5	10	10	147	0,01	6,52	305
F6	50	10	91	0,01	7,52	306
F7	10	10	145	0,01	7,52	309
F8	30	10	121	0,01	6,54	306
F9	10	10	147	0,01	7,01	310
F10	30	10	122	0,01	7,02	304

Los resultados se muestran en la tabla 81 a continuación, que expone la actividad de hialuronidasa en U/ml y la relación de la actividad en comparación con el tiempo 0. Las formulaciones F2-F9, que contenían todas Lys-Lys, mostraron una estabilidad de rHuPH20 mejorada frente a la fórmula de referencia F1, independientemente del pH. No se observó una diferencia significativa entre las muestras que contenían 10, 30 o 50 mM de Lys-Lys, lo que indica que la adición de Lys-Lys 10 mM es suficiente para mejorar la estabilidad de rHuPH20 a 40 °C. Las formulaciones con un pH mayor (7,5) tenían actividad enzimática reducida en comparación con todas las muestras con menor pH (6,5 o 7,0). Por ejemplo, para las muestras que tenían un pH de 6,5 o 7,0, la actividad de hialuronidasa tras 4 semanas de incubación a 40 °C permaneció por encima del 80 % de la actividad inicial, mientras que las muestras que tenían un pH de 7,5 retuvieron únicamente aproximadamente el 70 % de la actividad inicial. Tras 4 semanas, permaneció menos de un 50 % de la actividad de rHuPH20 para la muestra de referencia de rHuPH20 (F1).

Tabla 81. Actividad de hialuronidasa a 40 °C

Form.	Actividad (U/ml)						Relación de actividad (T _x /T ₀)				
	0	1 W	2 W	3 W	4 W	8 W	1 W	2 W	3 W	4 W	8 W
F1 Hylenex™	169	127	105	84	73	43	0,75	0,62	0,50	0,43	0,25
F2	149	141	141	133	132	114	0,95	0,95	0,89	0,89	0,76
F3	146	123	128	110	113	84	0,84	0,87	0,75	0,77	0,58
F4	152	148	152	143	139	118	0,97	1,00	0,94	0,91	0,78
F5	159	151	148	141	140	107	0,95	0,93	0,89	0,88	0,67
F6	148	133	130	114	111	82	0,90	0,87	0,76	0,75	0,55
F7	156	130	129	110	101	87	0,84	0,83	0,71	0,95	0,56
F8	156	141	144	137	132	107	0,90	0,92	0,88	0,85	0,68
F9	155	140	136	134	127	109	0,91	0,88	0,86	0,82	0,70
F10	153	146	141	137	135	112	0,95	0,92	0,90	0,88	0,73

Ejemplo 25

Efecto de lisil lisina en la actividad de rHuPH20 y estabilidad de insulina en coformulaciones de rHuPH20/insulina

Se evaluó la lisil lisina respecto de su capacidad para estabilizar las coformulaciones que contenían tanto rHuPH20 como un análogo de insulina. Las formulaciones se exponen en la tabla 82 a continuación. Todas las formulaciones

contenían 600 U/ml de rHuPH20, 3,5 mg/ml de insulina glulisina, Tris-HCl 30 mM, metionina 5 mM, polisorbato 20 al 0,001 %, pH 7,2, y fenol al 0,1 % y m-cresol al 0,15 % como conservantes (niveles de conservante EP-B). Las formulaciones F5, F1, F2 y F3 contenían NaCl 50 mM y 0 mM, 20 mM, 40 mM y 80 mM de Lys-Lys, respectivamente. La formulación F4 contenía una mayor concentración de NaCl (140 mM) y no contenían Lys-Lys. La osmolalidad de las formulaciones F3 y F4 se ajustó con NaCl para que fuesen aproximadamente la misma.

Cada formulación se alicuotó a 1,0 ml y se filtró en viales de vidrio de borosilicato de tipo I USP de 2 ml con tapones de goma gris de 13 mm 4432/50 y se sellaron con sellos de aluminio. Los viales se incubaron a 5 °C y 37 °C. Se extrajeron muestras en los días 3 y 6 y se ensayaron respecto de la actividad enzimática de hialuronidasa, pH, osmolalidad y apariencia, tal como se describe en los Ejemplos 2 y 3.

Tabla 82. Formulaciones que contienen 600 U/ml de rHuPH20 y 3,5 mg/ml de glulisina

Form.	pH	Tampón	Modificador de la tonicidad	Estabilizantes			Conservantes	
		Tris/Cl mM	NaCl mM	Metionina mM	PS20 %	Lys-Lys mM	% de fenol	% de m-cresol
F1	7,2	30	50	5	0,001	20	0,100	0,150
F2	7,2	30	50	5	0,001	40	0,100	0,150
F3	7,2	30	50	5	0,001	80	0,100	0,150
F4	7,2	30	140	5	0,001	0	0,100	0,150
F5	7,2	30	50	5	0,001	0	0,100	0,150

La adición de lisil lisina no afectó a la apariencia ya que todas las formulaciones fueron transparentes e incoloras sin partículas visibles, lo que indica la estabilidad de la insulina. La actividad de hialuronidasa, extrapolada a partir de una curva patrón, de las formulaciones ensayadas se muestra en la tabla 83 a continuación. Todas las formulaciones retuvieron actividad de hialuronidasa tras su incubación durante 6 días a 5 °C. Solo la formulación F3, que contenía Lys-Lys 80 mM, retuvo cierta actividad enzimática de hialuronidasa tras 3 días a 37 °C. Tras 6 días a 37 °C. F3 había perdido la mayoría de su actividad enzimática de hialuronidasa. Cuando se controló la osmolalidad para que fuese generalmente comparable, como en las formulaciones F3 y F4, Lys-Lys fue mejor estabilizante de rHuPH20 que el NaCl, tal como se hace evidente por la actividad de hialuronidasa aumentada.

Tabla 83. Actividad enzimática de hialuronidasa (U/ml) y osmolalidad

Form.	Osmolalidad (mOsm)	5 °C	37 °C	37 °C
		6d	3d	6d
F1	238	556	13	-18
F2	288	589	63	1
F3	396	563	165	79
F4	347	582	70	9
F5	182	541	5	-4

Ejemplo 26

Comparación de lisil lisina y NaCl en la estabilidad de rHuPH20 en coformulaciones de rHuPH20/insulina

Las coformulaciones de insulina y rHuPH20 se ensayaron respecto de los efectos de lisil lisina y NaCl en la estabilidad de rHuPH20. Las formulaciones ensayadas se generaron para que tuviesen igual fuerza iónica, pero con una formulación conteniendo lisil lisina y NaCl y la otra formulación conteniendo solo NaCl. Específicamente, se prepararon tres conjuntos de formulaciones de insulina glulisina y rHuPH20 que tenían diferentes niveles de fuerza iónica. Las formulaciones se exponen en la tabla 84 a continuación. Todas las formulaciones contenían 600 U/ml de rHuPH20, 3,5 mg/ml de insulina glulisina, Tris-HCl 30 mM, metionina 5 mM, polisorbato 20 al 0,001 %, pH 7,2, y fenol al 0,1 % y m-cresol al 0,15 % como conservantes (niveles de conservante EP-B). Las formulaciones F1, F3 y F5 contenían lisil lisina y NaCl tal como se expone en la tabla 84 a continuación. Las formulaciones F2, F4 y F6 contenían solo NaCl. Las formulaciones se ensayaron respecto de su pH y osmolalidad reales.

Cada formulación se alicuotó a 1,0 ml y se filtró en viales de vidrio de borosilicato de tipo I USP de 2 ml con tapones de goma gris de 13 mm 4432/50 y se sellaron con sellos de aluminio. Los viales se incubaron a 5 °C y 30 °C durante hasta 4 semanas. Se extrajeron muestras en el día 6 y tras 2 y 4 semanas y se ensayaron respecto de la actividad enzimática de hialuronidasa, tal como se describe en el ejemplo 2.

Tabla 84. Formulaciones que contienen 600 U/ml de rHuPH20 y 3,5 mg/ml de glulisina

Form.	pH	Tampón	Modificador de la tonicidad	Estabilizantes			Conservantes	
		Tris/Cl mM	NaCl mM	Metionina mM	PS20 %	Lys-Lys mM	% de fenol	% de m-cresol
F1	7,2	30	40	5	0,001	20	0,100	0,150

Tabla 84. Formulaciones que contienen 600 U/ml de rHuPH20 y 3,5 mg/ml de glulisina

Form.	pH	Tampón	Modificador de la tonicidad	Estabilizantes			Conservantes	
		Tris/Cl mM	NaCl mM	Metionina mM	PS20 %	Lys-Lys mM	% de fenol	% de m-cresol
F2	7,2	30	60	5	0,001	Ninguno	0,100	0,150
F3	7,2	30	80	5	0,001	40	0,100	0,150
F4	7,2	30	120	5	0,001	Ninguno	0,100	0,150
F5	7,2	30	160	5	0,001	80	0,100	0,150
F6	7,2	30	240	5	0,001	Ninguno	0,100	0,150

Los resultados se muestran en la tabla 85 a continuación, que expone la actividad enzimática de hialuronidasa (U/ml) en los días ensayados, así como el % de actividad de hialuronidasa en comparación con la actividad mostrada a T0 (% a T0). Se llevó a cabo un análisis multivariable de la actividad enzimática de rHuPH20 en respuesta al tiempo de incubación, la concentración de lisil lisina y la fuerza iónica basándose en la actividad relativa a T0, y se analizaron mediante JMP v. 8.02 (SAS Institutes). Las formulaciones que tenían una mayor fuerza iónica (F5 y F6) retenían una mayor actividad enzimática de hialuronidasa que las formulaciones que tenían menor fuerza iónica (F1 y F2) ($p < 0,001$). Además, las formulaciones que contenían lisil lisina tenían una actividad significativamente mayor que aquellos sin ella ($p = 0,04$). La velocidad de pérdida de actividad enzimática de hialuronidasa se correlacionó inversamente con la fuerza iónica, lo que indica que una mayor fuerza iónica podría reducir significativamente la velocidad de degradación. Para las soluciones con la misma fuerza iónica (por ejemplo, F5 y F6) no se observó una diferencia significativa tras dos semanas, sin embargo, tras 4 semanas a 30 °C, se observó una diferencia significativa en la actividad enzimática de hialuronidasa, en donde F5 contenía lisil lisina y reteniendo un 91 % de actividad pero F6, que no contenía lisil lisina, tenía únicamente un 75 % de actividad restante. Se observó la misma tendencia para las formulaciones a menor fuerza iónica, con formulaciones que contienen lisil lisina que tiene actividad aumentada en comparación con aquellas sin lisil lisina.

Tabla 85. pH, osmolalidad y actividad enzimática de rHuPH20 a 30 °C

Form.	pH	Osmolalidad (mOsm)	actividad de rHuPH20, U/ml (% a T0)			
			T0	6d	2w	4w
F1	7,17	204	567 (100 %)	505 (89 %)	405 (71 %)	288 (51 %)
F2	7,22	210	523 (100 %)	416 (80 %)	334 (64 %)	222 (42 %)
F3	7,23	321	543 (100 %)	517 (95 %)	481 (88 %)	400 (73 %)
F4	7,20	312	528 (100 %)	471 (89 %)	438 (83 %)	332 (63 %)
F5	7,22	542	525 (100 %)	522 (99 %)	496 (94 %)	476 (91 %)
F6	7,19	531	511 (100 %)	533 (104 %)	498 (97 %)	382 (75 %)

Ejemplo 27

Efecto de lisil lisina como tampón y efectos de la temperatura en el cambio de pH de las coformulaciones de rHuPH20/insulina

La lisil lisina se evaluó respecto de su capacidad para actuar como tampón en las coformulaciones que contienen rHuPH20 e insulina reemplazando a Tris con lisil lisina. Las formulaciones ensayadas se exponen en la tabla 86 a continuación. Todas formulaciones se generaron para contener 600 U/ml de rHuPH20, 3,5 mg/ml de insulina glulisina, metionina 5 mM, polisorbato 20 al 0,001 %, pH 7,2, y fenol al 0,1 % y m-cresol al 0,15 % como conservantes (niveles de conservante EP-B). Cada formulación contenía 30, 50, 80 o 105 mM de lisil lisina (Biopeptide, G-2675, Lote n.º 1037762). Ninguna formulación contenía Tris HCl. Se añadió NaCl para ajustar la osmolalidad final a 380 ± 30 mOsm.

Cada formulación se alicuotó a 1,0 ml y se filtró en viales de vidrio de borosilicato de tipo I USP de 2 ml con tapones de goma gris de 13 mm 4432/50 y se sellaron con sellos de aluminio. Los viales se incubaron a 5 °C y 37 °C. Se extrajeron muestras en los días 1, 4 y 6 y se ensayaron respecto de la actividad enzimática de hialuronidasa, pH y osmolalidad, tal como se describe en los Ejemplos 2 y 3. También se ensayó cada formulación para evaluar la capacidad de la lisil lisina para actuar como tampón al intervalo de pH diana de pH 6,5 a 8,0 generando una curva de titulación del pH en función de la cantidad de titulante (NaOH 1 N, EMD, n.º de cat. SX0607H-6, Lote HC067239) que se había añadido.

Tabla 86. Formulaciones que contienen 600 U/ml de rHuPH20 y 3,5 mg/ml de glulisina

Form.	pH	Modificador de la tonicidad	Estabilizantes			Conservantes	
		NaCl mM	Metionina mM	PS20 %	Lys-Lys mM	% de fenol	% de m-cresol
F1	7,2	0	5	0,001	105	0,100	0,150
F2	7,2	40	5	0,001	80	0,100	0,150
F3	7,2	85	5	0,001	50	0,100	0,150

Tabla 86. Formulaciones que contienen 600 U/ml de rHuPH20 y 3,5 mg/ml de glulisina

Form.	pH	Modificador de la tonicidad	Estabilizantes			Conservantes	
		NaCl mM	Metionina mM	PS20 %	Lys-Lys mM	% de fenol	% de m-cresol
F4	7,2	115	5	0,001	30	0,100	0,150

Los resultados se muestran en la tabla 87, que expone la osmolalidad y la actividad enzimática de hialuronidasa. Tal como se muestra en ejemplos anteriores, Lys-Lys estabilizó a rHuPH20 en las formulaciones ya que la actividad de hialuronidasa se redujo menos con mayores concentraciones de Lys-Lys. Además, la lisil lisina fue capaz de estabilizar a rHuPH20 más que NaCl a un nivel similar de fuerza iónica.

Tabla 87. Osmolalidad y actividad de hialuronidasa

Form.	Osmolalidad (mOsm)	actividad de rHuPH20, U/ml			
		T0	1d	4d	6d
F1	373	507	408	263	134
F2	382	550	411	218	85
F3	410	535	403	213	81
F4	368	582	421	170	54

La tabla 88 a continuación expone el pH a diversas temperaturas y el efecto de la temperatura en el pH. La titulación de lisil lisina con NaOH reveló que la lisil lisina puede servir como tampón a un intervalo de pH de 6,5 a 8,0, especialmente a concentraciones más altas (por ejemplo, 80 o 105 mM). Tal como se muestra en la tabla 88, el efecto de la temperatura (dpH/dT), o la relación del cambio en el pH al cambio en la temperatura, permanecieron constantes, a -0.033 U/ °C, que es ligeramente mayor que la comunicada para Tris (-0,028 U/ °C). Un tampón ideal tiene un mayor efecto de temperatura, ya que a menores temperaturas de almacenamiento (por ejemplo, 2-8 °C) la insulina se beneficia de un pH mayor mientras que a temperaturas menores, rHuPH20 se beneficia de un pH menor. Por lo tanto, se demuestra que la lisil lisina es tanto un tampón óptimo como un estabilizante en las formulaciones que contienen tanto insulina como rHuPH20.

Tabla 88. Efecto de la temperatura en el pH

Form.	pH real a temperatura			Efecto de temperatura
	0 °C	22 °C	37 °C	dpH/dT (U/ °C)
F1	7,93	7,20	6,72	-0,033
F2	7,93	7,26	6,71	-0,033
F3	7,96	7,26	6,73	-0,033
F4	7,94	7,23	6,72	-0,033

Ejemplo 28

Estabilidad de rHuPH20 en las coformulaciones de insulina que contienen lisil lisina a lo largo del tiempo a 5 °C, 30 °C y 37 °C

Se ensayó la lisil lisina respecto de su capacidad para estabilizar las coformulaciones de análogo de insulina-rHuPH20 que contienen niveles USP de conservantes. Las formulaciones se exponen en la tabla 89 a continuación. Cada formulación contiene 600 U/ml de rHuPH20, 3,5 mg/ml de análogo de insulina (bien insulina glulisina o insulina aspart), metionina 5 mM, tensioactivo al 0,001 % (bien poloxamer 188 o polisorbato 20), y niveles USP de conservantes (fenol al 0,125 % y m-cresol al 0,075 %). Para cada análogo de insulina, dos formulaciones tenían un pH de 7,0 y dos formulaciones tenían un pH de 7,2. Además, a cada pH, una formulación contenía únicamente lisil lisina 100 mM mientras que la otra formulación contenía NaCl 30 mM y lisil lisina 80 mM. Como comparación para la insulina aspart, se preparó F9 que contenía Tris/HCl 30 mM.

Cada formulación se alicuotó a 1,0 ml y se filtró en viales de vidrio de borosilicato de tipo I USP de 2 ml con tapones de goma gris de 13 mm 4432/50 y se sellaron con sellos de aluminio. Los viales se incubaron a 5 °C, 30 °C y 37 °C durante hasta 4 semanas. Se extrajeron muestras tal como se indica en las tablas 90 y 91 y se ensayaron respecto de la actividad enzimática de rHuPH20 tal como se describe en el ejemplo 2. Los resultados se muestran en las tablas 90 y 91 a continuación, que exponen la actividad enzimática de hialuronidasa en U/ml.

Tabla 89. Formulaciones que contienen 600 U/ml de rHuPH20 y 3,5 mg/ml de análogo de insulina

Form.	PH	Tampón Tris/Cl mM	Modificador de la tonicidad		Estabilizantes		Tensioactivo		Conservantes		API Análogo de insulina
			NaCl mM	Metionina mM	Lys-Lys mM	F68 %	PS20 %	% de fenol	% de m-cresol		
F1	7,0	0	0	5	100			0,001	0,125	0,075	Glulisina
F2	7,0	0	30	5	80			0,001	0,125	0,075	Glulisina
F3	7,2	0	0	5	100			0,001	0,125	0,075	Glulisina
F4	7,2	0	30	5	80			0,001	0,125	0,075	Glulisina
F5	7,0	0	0	5	100		0,01		0,125	0,075	aspart
F6	7,0	0	30	5	80		0,01		0,125	0,075	aspart
F7	7,2	0	0	5	100		0,01		0,125	0,075	aspart
F8	7,2	0	30	5	80		0,01		0,125	0,075	aspart
F9	7,2	30	100	5	0		0,01		0,125	0,075	aspart

*F68 = poloxamer 188 (Pluronic® F68); PS20 = polisorbato 20.

1. Coformulaciones de rHuPH20-insulina glulisina

Tal como se muestra en la tabla 90, para las formulaciones de rHuPH20-insulina glulisina, la actividad de hialuronidasa permaneció constante para todas las formulaciones a 5 °C y 30 °C. A 37 °C, se observó una reducción en la actividad de hialuronidasa a lo largo del tiempo entre todas las formulaciones. Durante el periodo de tiempo ensayado, se determinó que las formulaciones eran estables, ya que ninguna de las formulaciones tenía actividad de hialuronidasa por debajo de 375 U/ml.

Form.	5 °C				30 °C		37 °C	
	T0	4w	2M	3M	2w	4w	3d	6d
F1	783	710	740	743	713	790	708	647
F2	811	770	776	745	741	834	726	678
F3	730	689	718	681	689	752	645	545
F4	688	655	718	646	665	676	581	491

2. Coformulaciones de rHuPH20-insulina aspart

Tal como se muestra en la tabla 91, para las formulaciones de rHuPH20-insulina aspart, todas las formulaciones fueron estables durante hasta 3 meses a 5 °C. A 30 °C, todas las formulaciones que contenían lisil lisina fueron estables durante hasta 4 semanas, mientras que la formulación F9 (que no contiene Lys-Lys) mostró una pérdida de actividad de hialuronidasa. A 37 °C, todas las formulaciones tuvieron actividad de hialuronidasa reducida con el paso del tiempo, dependiendo la velocidad de reducción de la formulación. Por ejemplo, tras 6 días a 37 °C, la formulación F5 (que tenía Lys-Lys 100 mM y pH 7,0) tenía una mayor actividad que la formulación F8 (que tenía Lys-Lys 80 mM y pH 7,2). En este instante y temperatura, la formulación F9 que no contenía lisil lisina perdió prácticamente toda la actividad de hialuronidasa.

Form.	5 °C				30 °C		37 °C	
	T0	4w	2M	3M	2w	4w	3d	6d
F5	741	661	762	775	677	726	622	505
F6	749	676	795	672	687	739	600	495
F7	712	625	726	635	601	656	544	413
F8	703	608	729	621	605	638	499	292
F9	806	695	851	713	582	448	279	65

Ejemplo 29

Efecto de la albúmina de suero humana (HSA) o lisil lisina en la estabilidad de rHuPH20 con agitación y estrés térmico

Las formulaciones de rHuPH20 se ensayaron respecto de su estabilidad en condiciones aceleradas, incluyendo agitación y estrés térmico. Las formulaciones se exponen en la tabla 92 a continuación. Cada formulación contenía 160 U/ml de rHuPH20, fosfato de sodio 12,5 mM, pH 7,0 y NaCl 145 mM. Cada formulación contenía además una o más de albúmina de suero humana (HSA), CaCl₂, EDTA, polisorbato 80, metionina y lisil lisina, tal como se expone en la tabla 92 a continuación.

Cada formulación se alicuotó a 1,5 ml y se filtró en viales de vidrio de borosilicato de tipo I USP de 2 ml con tapones de goma gris de 13 mm 4432/50 y se sellaron con sellos de aluminio. Los viales que contenían partículas visibles se excluyeron del estudio. Las formulaciones se ensayaron tanto con agitación como con estrés térmico. Para el estudio de agitación, se incubaron 2 muestras de cada formulación a 25 °C y se agitaron a 650 rpm durante 72 horas. Para el estudio de estrés térmico, se incubaron 4 muestras de cada formulación a 40 °C durante hasta 4 semanas, extrayéndose muestras cada semana.

Form.	PH20 U/ml	Tampón, pH	NaCl mM	HSA mg/ml	CaCl ₂ mM	EDTA %	PS80 %	Met mM	Lys-Lys mM
F1	160	NaPO ₄ 12,5 mM 7,0	145	1	2,7	0,1	0	0	0
F2	160	NaPO ₄ 12,5 mM 7,0	145	1	0	0	0	0	0
F3	160	NaPO ₄ 12,5 mM 7,0	145	1	0	0	0,02	0	0

Tabla 92. Formulaciones de rHuPH20

Form.	PH20 U/ml	Tampón, pH	NaCl mM	HSA mg/ml	CaCl ₂ mM	EDTA %	PS80 %	Met mM	Lys-Lys mM
F4	160	NaPO ₄ 12,5 mM 7,0	145	0	0	0	0,02	10	0
F5	160	NaPO ₄ 12,5 mM 7,0	145	0	0	0	0,04	10	0
F6	160	NaPO ₄ 12,5 mM 7,0	145	0	0	0	0,06	10	0
F7	160	NaPO ₄ 12,5 mM 7,0	145	0	0	0	0,02	10	10

Todas las muestras se ensayaron respecto de la actividad de hialuronidasa, tal como se describe en el ejemplo 2. Se ensayó la presencia de partículas insolubles y solubles usando obtención de imágenes MicroFlow (MFI). Para esto, cada formulación de rHuPH20 o de control se midió con un instrumento Micro-Flow Imaging modelo 4200 (Brightwell Technologies, Inc., Ottawa, Canadá). Antes de cada ejecución, se filtró tampón de blanco a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se enjuagó a través del sistema para proporcionar un fondo limpio e iluminación optimizada. Para equilibrar el sistema, se dispensaron al menos 2 ml de muestra antes del análisis. Se ejecutaron muestras de un (1) ml a un caudal de 170 µl/min usando una bomba peristáltica. La configuración de magnificación fue 5 X para permitir la detección de partículas dentro del intervalo de 1 a 100 µm con un análisis de profundidad de campo de 100 µm. Las partículas se contaron y registraron automáticamente por la máquina y se comunicaron como número de partículas/ml. El tampón y/o las formulaciones que contenían rHuPH20 pero que no se sometieron a agitación se usaron como controles. También se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaño tal como se describe en el ejemplo 4. Los resultados se muestran en las tablas 93-95 a continuación.

15 1. Actividad de hialuronidasa

La tabla 93 expone la actividad de hialuronidasa en U/ml y el % de actividad en comparación con tiempo 0 (T₀). Los resultados muestran que tras 8 días a 40 °C, las formulaciones que no contenían HSA (F4, F5 y F6) tenían actividad de hialuronidasa reducida en comparación con las formulaciones F1, F2 y F3 que contenían HSA. La formulación F7, que contenía Lys-Lys, retuvo el mayor nivel de actividad de hialuronidasa tras 15 días a 40 °C.

Tras el estrés por agitación, las formulaciones que contenían al menos un 0,04 % de polisorbato 80 y metionina 10 mM retuvieron actividad de hialuronidasa, al igual que lo hicieron las formulaciones que contienen Lys-Lys. Las formulaciones F1-F4 tuvieron una ligera disminución en la actividad de hialuronidasa. En general, la formulación F7 (que contenía Lys-Lys) mostró la máxima retención en actividad enzimática de rHuPH20 tanto en la prueba de estrés térmico como en la prueba de agitación.

Tabla 93. Actividad de hialuronidasa con agitación y estrés térmico

Form.	Tiempo 0	Agitación a 25 °C, 72h U/ml (% de t ₀)	40 °C, 8 días U/ml (% de t ₀)	40 °C, 15 días U/ml (% de t ₀)
F1	155	146 (94)	149 (96)	139 (90)
F2	154	144 (94)	150 (97)	134 (87)
F3	153	142 (93)	153 (100)	132 (86)
F4	155	148 (96)	122 (79)	100 (65)
F5	153	158 (103)	110 (72)	105 (69)
F6	153	157 (103)	117 (76)	107 (70)
F7	151	153 (101)	147 (97)	147 (97)

30 2. Presencia de proteína agregada o de agregados insolubles

La tabla 94 expone los recuentos de partículas (agregados insolubles) en número de partículas/ml para cada intervalo micrométrico. Por ejemplo, los intervalos de tamaño micrométricos que se ensayaron usando MFI fueron partículas (p) mayores de 5 micrómetros (µm) pero menores de 10 µm (5 ≤ p < 10), 10 ≤ p < 25, 25 ≤ p < 50 y p ≥ 50. Se generaron formulaciones de control para F1 y F4 que no contenían rHuPH20, y formulaciones de control para las muestras F2, F4 y F6 fueron las mismas formulaciones que no se agitaron.

La presencia o ausencia de HSA no afectó a las muestras de control no agitadas, teniendo cada una recuentos de partículas aproximadamente iguales. Una vez agitadas, las formulaciones que contenían HSA pero que carecían de polisorbato 80 (F1 y F2) tuvieron significativamente más partículas que todas las otras formulaciones, incluyendo F3 que solo difirió de F2 por la adición de polisorbato 80. La adición de más polisorbato 80 (F5 y F6 en comparación con F4) no tuvieron un efecto significativo en la reducción de formación de agregado. La formulación F7, que contenía Lys-Lys, tuvo los menores números de agregados insolubles tras la agitación.

Tabla 94. Recuentos de partículas medidos mediante MFI (número de partículas/ml)

	Agitación				Control (muestras no agitadas)				Tampón (sin rHuPH20)			
	5 ≤ p < 10	10 ≤ p < 25	25 ≤ p < 50	p ≥ 50	5 ≤ p < 10	10 ≤ p < 25	25 ≤ p < 50	p ≥ 50	5 ≤ p < 10	10 ≤ p < 25	25 ≤ p < 50	p ≥ 50
1	9770	5385	1090	248	---	---	---	---	403	58	7	0
2	10858	6930	795	139	1257	397	15	0	---	---	---	---
3	2895	382	39	10	---	---	---	---	---	---	---	---
4	2380	267	27	7	1356	167	0	3	31	8,0	0	0
5	2313	211	5	0	---	---	---	---	---	---	---	---
6	2610	432	41	8	1667	150	6	0	---	---	---	---
7	1299	129	5	0	---	---	---	---	---	---	---	---

p - tamaño de partícula (micrómetros)

3. Cromatografía de exclusión por tamaño

5 También se midieron los agregados solubles mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La tabla 95 expone los agregados solubles (agregados de alto peso molecular) en mAu*min y el porcentaje de área de pico total. Las formulaciones F4 a F7 contenían demasiada poca proteína como para detectarla mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Las formulaciones F1-F3, que contenían HSA, mostraron niveles de agregados de alto peso molecular tras agitación a 25 °C. La adición de polisorbato 80 redujo el número general de agregados (F3 en comparación con F1 o F2).

10

Tabla 95. Agregados solubles medidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño en mAu*min (% del área total del pico)

Form.	Control		Agitación	
	5 °C, T0		72 h a 650 rpm (25 °C)	
SEC	Principal	HMW	Principal	HMW
F1	4066 (97,9)	86 (2,1)	4020 (97,1)	120 (2,9)
F2	4023 (98,0)	81 (2,0)	3913 (97,3)	108 (2,7)
F3	3970 (98,0)	82 (2,0)	3950 (98,0)	79 (2,0)
F4	20	ND	19	ND
F5	21	ND	19	ND
F6	22	ND	21	ND
Fs7	21	ND	20	ND

HMW = alto peso molecular

Ya que las modificaciones serán evidentes para los expertos en la materia, se prevé que la presente invención esté solo limitada por el ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Halozyme, Inc. Yang, Tzung-Horng LaBarre, Michael James Vaughn, Daniel Edward Caster, Christopher L. Nicol, Francois Kim, Donghyun

20 <120> FORMULACIONES ESTABLES DE UNA ENZIMA DEGRADANTE DE HIALURONANO

<130> 33320-3085PC

<140> Aún sin asignar

25 <141> Adjunto

<150> US 61/520.962

<151> 17/06/2011

30 <160> 273

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

35 <211> 509

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

40 <223> PH20 humana precursora

<400> 1

```

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

```

ES 2 566 549 T3

				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*

5

<220>
 <223> PH20 madura

10

<400> 2

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

ES 2 566 549 T3

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

5

<220>
 <223> rHuPH20 soluble precursor

10

<400> 3

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1          5          10
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*

5

<220>
 <223> 1-447 de rHuPH20 soluble

10

<400> 4

```

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

      50      55      60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65      70      75      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> 1-446 de rHuPH20 soluble

5

<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*

5

<220>
 <223> 1-445 de rHuPH20 soluble

10

<400> 6

ES 2 566 549 T3

```

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1      5      10      15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro

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

```

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

5

<220>
 <223> 1-444 de rHuPH20 soluble

<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
						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*

<220>
<223> 1-443 de rHuPH20 soluble

5
<400> 8

10
<210> 9
<211> 442
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15
<220>
<223> 1-442 de rHuPH20 soluble
<400> 9

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

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

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 10

5

```

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 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*

5 <220>
 <223> PH20

<400> 11

```

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

ES 2 566 549 T3

		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

10

<400> 12

```

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

305      310      315      320
Pro Ile Ala Ile Asn Val Thr Glu Ala Val Asn
      325      330

```

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

<220>
 <223> hialuronidasa B

<400> 13

5

10

```

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
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*

5

<220>
 <223> hialuronidasa

10

<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*

5

<220>
 <223> hialuronidasa

10

<400> 15

Ser	Glu	Arg	Pro	Lys	Arg	Val	Phe	Asn	Ile	Tyr	Trp	Asn	Val	Pro	Thr
1				5					10					15	
Phe	Met	Cys	His	Gln	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Phe	Asp	Glu	Val	Thr	Asn	Phe
			20					25					30		
Asn	Ile	Lys	His	Asn	Ser	Lys	Asp	Asp	Phe	Gln	Gly	Asp	Lys	Ile	Ser
		35					40					45			
Ile	Phe	Tyr	Asp	Pro	Gly	Glu	Phe	Pro	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Lys	Glu
	50					55					60				
Gly	Asn	Tyr	Lys	Ile	Arg	Asn	Gly	Gly	Val	Pro	Gln	Glu	Gly	Asn	Ile
65					70					75					80
Thr	Ile	His	Leu	Gln	Arg	Phe	Ile	Glu	Asn	Leu	Asp	Lys	Thr	Tyr	Pro
				85					90					95	
Asn	Arg	Asn	Phe	Asn	Gly	Ile	Gly	Val	Ile	Asp	Phe	Glu	Arg	Trp	Arg
			100					105					110		
Pro	Ile	Phe	Arg	Gln	Asn	Trp	Gly	Asn	Met	Met	Ile	His	Lys	Lys	Phe
		115					120					125			
Ser	Ile	Asp	Leu	Val	Arg	Asn	Glu	His	Pro	Phe	Trp	Asp	Lys	Lys	Met
	130					135					140				
Ile	Glu	Leu	Glu	Ala	Ser	Lys	Arg	Phe	Glu	Lys	Tyr	Ala	Arg	Leu	Phe
145					150						155				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	Ser	Asp	Val	Asn
	290					295						300			Ser
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

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*

5

<220>
 <223> hialuronidasa

10

<400> 17

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

<211> 473
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <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
    
```

10

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*

5

<220>
 <223> hialuronidasa 3

10

<400> 19

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

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

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

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 20

5

```

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
    
```

ES 2 566 549 T3

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

5

<220>
 <223> Hialuronidasa 3

<400> 21

10

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

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

5

<220>
 <223> Hialuronidasa 1

10

```

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


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

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

<220>
 <223> Hialuronidasa 2

<400> 23

5

10

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

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

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

5

<220>
 <223> Hialuronidasa 3

10

<400> 24

```

Met Ile Thr Gln Leu Gly Leu Thr Leu Val Val Gly Leu Thr Leu Cys
1      5      10      15
Leu Val His Val Gln Ala Leu Leu Gln Val Pro Glu Phe Pro Phe Ser

          20          25          30
Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala Arg Cys Lys Thr Arg Phe Gly Val
35          40          45
His Leu Pro Leu Asp Ala Leu Gly Ile Ile Ala Asn His Gly Gln Arg
50          55          60
Phe His Gly Gln Asn Ile Thr Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Phe Gly Leu
65          70          75
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 Met Phe Pro Asp
145         150         155
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
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
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
Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Leu Glu Pro Lys Pro
405         410
    
```

ES 2 566 549 T3

<210> 25

<211> 545

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<220>

<223> PH20

10 <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

<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 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

ES 2 566 549 T3

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

<220>
 <223> Secuencia parcial de PH20
 10 <400> 27

```

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

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

<220>
 20 <223> Hialuronidasa 3
 <400> 28

```

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


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

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

5

<220>
 <223> PH20

10

<400> 29

ES 2 566 549 T3

Met	Gly	Val	Leu	Lys	Phe	Lys	His	Ile	Phe	Phe	Arg	Ser	Phe	Val	Lys
1				5					10					15	
Ser	Ser	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys
			20					25					30		
Cys	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	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
						135						140			
Ile	Asp	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro
145					150					155					160
Lys	Asp	Val	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn
				165					170					175	
Val	Gln	Leu	Ser	Leu	Pro	Gln	Ala	Thr	Asp	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe

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

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

5

<220>
 <223> PH20

10

<400> 30

ES 2 566 549 T3

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

```

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

```

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

<220>
 <223> PH20

<400> 31

```

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

```

5

<210> 32

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

5 <220>
 <223> PH20

<400> 32

```

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

ES 2 566 549 T3

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*

5

<220>
 <223> hialuronidasa

10

<400> 33

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

Met Met Asp Leu Ser Arg Gly Arg Ala Ile Ser Arg Glu Asn Glu Thr
 355 360 365
 Ser His Ser Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ser
 370 375 380
 Asp Ala Met Asp Asp Ser Thr Lys Ala Lys Tyr Lys Lys Ile Val Lys
 385 390 395 400
 Ser Ser Val Glu Ser Asp Ser Ser Tyr Lys Gln Asn Asp Tyr Leu Asn
 405 410 415
 Ser Tyr Ser Asp Ile Asp Lys Met Lys Ser Leu Met Thr Asp Asn Ser
 420 425 430
 Ile Ser Lys Asn Gly Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met
 435 440 445
 Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu
 450 455 460
 Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu
 465 470 475 480
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn
 485 490 495
 Ser Asp Val Lys His Tyr His Asp Asn Phe Trp Val Thr Ala Asp Met
 500 505 510
 Lys Arg Leu Ser Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu Ile Leu Lys Asp
 515 520
 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

5

<400> 34

```

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

```

10 <210> 35
 <211> 1628
 <212> PRT
 <213> *Clostridium perfringens*

15 <220>

<223> hialuronidasa

<400> 35

Met Asn Lys Asn Ile Arg Lys Ile Ile Thr Ser Thr Val Leu Ala Ala
1 5 10 15

5

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

	530				535				540						
Glu	Leu	Ile	Ala	Glu	Phe	Thr	Asn	Leu	Gln	Lys	Ala	Ala	Asp	Tyr	Tyr
545					550					555					560
Lys	Asn	Asn	Pro	Gly	Asn	Glu	Arg	Thr	Arg	Asp	Gln	Ile	Ile	Tyr	Trp
				565					570						575
Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	Asp	Thr	Met	Asp	Ala	Ala	Ile	Gly	Tyr	Leu	Lys
			580					585					590		
Ser	Ala	Ile	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Asp	Asp	Glu	Ala	Ala	Trp	Ala	Asn
		595					600					605			
Tyr	Ser	Glu	Ala	Gln	Gly	Ala	Phe	Glu	Lys	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Phe
		610				615					620				
His	Tyr	Val	Asp	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Glu	Val	Gly	Val	Gln	His	Ile
625					630					635					640
Val	Pro	Phe	Ile	Lys	Ser	Met	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Val	Ile	Gly
			645					650						655	
Ser	Ile	Val	Asp	Pro	Asn	Arg	Ile	Ile	Ala	Thr	Tyr	Ile	Ser	Asn	Arg
			660				665							670	
Gln	Asp	Ala	Pro	Thr	Gly	Asn	Pro	Asp	Asn	Ile	Phe	Asp	Asn	Asn	Ala
		675					680					685			
Ser	Thr	Glu	Leu	Val	Tyr	Lys	Asn	Pro	Asn	Arg	Ile	Asp	Val	Gly	Thr
		690				695					700				
Tyr	Val	Gly	Val	Lys	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ile	Thr	Leu	Asn	Asn	Val	Glu
705					710					715					720
Phe	Leu	Met	Gly	Ala	Asn	Ser	Asn	Pro	Asn	Asp	Thr	Met	Gln	Lys	Ala
			725							730					735
Lys	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Asp	Gly	Arg	Glu	Trp	Ile	Asp	Leu	Glu	Glu
		740						745					750		
Gly	Val	Glu	Tyr	Thr	Met	Pro	Gly	Ala	Ile	Lys	Val	Glu	Asn	Leu	Asp
		755					760					765			
Leu	Lys	Val	Arg	Gly	Val	Arg	Leu	Ile	Ala	Thr	Glu	Ala	Arg	Glu	Asn
		770				775					780				
Thr	Trp	Leu	Gly	Val	Arg	Asp	Ile	Asn	Val	Asn	Lys	Lys	Glu	Asp	Ser
785					790					795					800
Asn	Ser	Gly	Val	Glu	Phe	Asn	Pro	Ser	Leu	Ile	Arg	Ser	Glu	Ser	Trp
			805						810					815	
Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Asn	Glu	Ala	Asn	Leu	Leu	Asp	Gly	Asp	Asp	Asn
		820					825						830		
Thr	Gly	Val	Trp	Tyr	Lys	Thr	Leu	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Leu	Ala	Gly
		835					840						845		
Glu	Phe	Ile	Gly	Leu	Asp	Leu	Gly	Lys	Glu	Ile	Lys	Leu	Asp	Gly	Ile
		850				855						860			
Arg	Phe	Val	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Asp	Lys	Trp	Asn
865					870					875					880
Lys	Phe	Lys	Leu	Glu	Tyr	Ser	Leu	Asp	Asn	Glu	Ser	Trp	Thr	Thr	Ile
			885							890					895
Lys	Glu	Tyr	Asp	Lys	Thr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly	Lys	Asp	Val	Ile	Glu
			900					905					910		
Glu	Ser	Phe	Glu	Thr	Pro	Ile	Ser	Ala	Lys	Tyr	Ile	Arg	Leu	Thr	Asn
		915					920					925			
Met	Glu	Asn	Ile	Asn	Lys	Trp	Leu	Thr	Phe	Ser	Glu	Phe	Ala	Ile	Ile
		930				935					940				
Ser	Asp	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Gly	Asn	Lys	Glu	Asn	Val	Tyr	Thr	Asn
945					950					955					960
Thr	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Asp	Val	Thr	Lys	Leu
			965							970					975
Ile	Pro	Thr	Asp	Asp	Ile	Ser	Leu	Asn	His	Gly	Glu	Tyr	Ile	Gly	Val
			980					985					990		
Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Ile	Asn	Leu	Glu	Ile	Ser
		995						1000					1005		
Asn	Asp	Thr	Gly	Leu	Lys	Leu	Gln	Ser	Ser	Met	Asn	Gly	Val	Glu	Trp
		1010				1015						1020			
Thr	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Asn	Thr	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Tyr	Val	Arg
1025					1030						1035				1040
Leu	Ile	Asn	Thr	Ser	Asn	Glu	Ala	Val	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Lys	Phe
					1045					1050					1055

Glu Val Asn Ser Asn Glu Val Tyr Glu Pro Ser Leu Val Asp Ala Tyr
 1060 1065 1070
 Val Gly Asp Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Asp Gly Asp Leu Lys Thr
 1075 1080 1085
 Arg Val Lys Phe Leu Gly Ala Pro Ser Thr Gly Asp Thr Ile Val Tyr
 1090 1095 1100
 Asp Leu Gly Gln Glu Ile Leu Val Asp Asn Leu Lys Tyr Val Val Leu
 1105 1110 1115
 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

ES 2 566 549 T3

1570 1575 1580
Lys Ile Asp Ile Gly Asp Leu Ala Met Val Ser Lys Asn Ile Gly Ser
1585 1590 1595 1600
Thr Thr Asn Thr Ser Leu Asp Leu Asn Lys Asp Gly Ser Ile Asp Glu
1605 1610 1615
Tyr Glu Ile Ser Phe Ile Asn His Arg Ile Leu Asn
1620 1625

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

- <220>
- 10 <223> Hialuronidasa-1 [Precursor]

- <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 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

ES 2 566 549 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

5 <223> Hialuronidasa-2 [Precursor]

<400> 37

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

ES 2 566 549 T3

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

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

5

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

10

<400> 38

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

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

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

<220>
 <223> Hialuronidasa-4

<400> 39

5

```

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
    
```

ES 2 566 549 T3

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*

5

<220>
 <223> 1-467 de precursor de sHuPH20

10

<400> 40

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

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

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

5

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

10

<400> 41

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

ES 2 566 549 T3

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

5

<220>
 <223> 1-478 de precursor de sHuPH20

10

<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										220	
Tyr	Asn	His	His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn
225															240
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser
															255
Thr	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val
															270
Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val
															285
Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr
															300
Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu
305															320
Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile
															335
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu
															350
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn
															365
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln
															380
Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu
385															400
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr
															415
Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys
															430
Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp
															445
Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys
															460
Ile	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro		
465															475

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

5

<220>
 <223> 1-479 de precursor de sHuPH20

10

<400> 43

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

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

ES 2 566 549 T3

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

5

<220>
 <223> 1-480 de precursor de sHuPH20

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

<210> 45
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-481 de precursor de sHuPH20

10

<400> 45

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

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

5

<220>
<223> 1-483 de precursor de sHuPH20

10

<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

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

5 <220>
<223> 36-467 de sHuPH20 maduro

<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*

5

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

<400> 48

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
    
```

ES 2 566 549 T3

420
425
430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
435
440
445

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

10
 <220>
 <223> ADN que codifica el "precursor" soluble de rHuPH20
 <400> 49

```

atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
tccagatag ttttcacott ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgta ttccaaatgt gcctttctct tgggcctgga atgcccgaag tgaattttgt 180
cttggaatat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccoga 240
ataaacgcca cgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacaatgatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcttta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatctt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg cactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttctct 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaaccctggt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaataaa aaagaaatga tgatctcagc tgggtgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggt 900
tttgcataata ccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
acocctcagta taatgogaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgott 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatcttct gaaaaatctt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac
    
```

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

20
 <220>
 <223> variante P48A de PH20
 <400> 50

ES 2 566 549 T3

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

5

<220>
 <223> variante L499W de precursor de PH20

10

<400> 51

ES 2 566 549 T3

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

Phe 50 Leu Trp Ala Trp Asn 55 Pro Ser Glu Phe Cys 60 Leu Gly Lys Phe
 Asp 65 Glu Pro Leu Asp Met 70 Ser Leu Phe Ser Phe 75 Ile Gly Ser Pro Arg
 Ile Asn Ala Thr Gly 85 Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr 100 Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 Gly Ile Pro Gln Lys 115 Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met 135 Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 Lys Asp Val Tyr Lys 165 Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe 200 Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 Tyr Asn His His Tyr Lys 230 Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 Ser Ile Trp Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu

<210> 52
 <211> 6630

<212> DNA
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> vector HZ24

<400> 52

tcaatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta	60
ttggocattg	catacgttgt	atctatatca	taatatgtac	atztatattg	gctcatgtcc	120
aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gactagttat	taatagtaat	caattacggg	180
gtcattagtt	catagcccat	atattggagt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	240
gocctggctga	ccgcccacg	acccocgccc	attgaogtca	ataatgacgt	atggtoccat	300
agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtatattac	ggtaaactgc	360
ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcatat	gccaaagtccg	ccccctattg	acgtcaatga	420
cggtaaatgg	cccgccctggc	attatgccc	gtacatgacc	ttacgggact	ttcctacttg	480
gcagtacatc	tacgtattag	tcacogctat	taccatggtg	atgvcggttt	ggcagtacac	540
caatgggogt	ggatagcgg	ttgactcag	gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	600
caatgggag	ttgttttggc	accaaaatca	acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaataaccc	660
cgccccgttg	acgcaaatgg	gcggtaggcg	tgtacgggtg	gaggtctata	taagcagagc	720
tcgttttagtg	aaccgtcaga	tcactagaag	ctttattgog	gtagtttatc	acagttaaat	780
tgctaacgca	gtcagtgcct	ctgacacaac	agtctogaac	ttaagctgca	gaagttggtc	840
gtgaggcact	gggcaggtaa	gtatcaaggt	tacaagacag	gtttaaggag	accaatagaa	900
actgggcttg	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	taggcaccta	ttggtcttac	960
tgacatccac	tttgcccttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	acagctctta	1020
aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggctagcatg	ggagtgttaa	aattcaagca	1080
catctttttc	agaagctttg	ttaaatcaag	tggagtatcc	cagatagttt	tcaccttctt	1140
tctgattcca	tgttgcttga	ctctgaattt	cagagcacct	cctgttattc	caaagtgtcc	1200
tttccctctg	gcctggaatg	ccccaaagtga	atthtgcctt	ggaaaatttg	atgagccact	1260
agatatgagc	ctcttctctt	tcataggaag	ccccogaata	aacgccaccg	ggcaagggtg	1320
tacaatattt	tatgttgata	gacttggcta	ctatccttac	atagattcaa	tcacaggagt	1380
aactgtgaat	ggaggaatcc	cccagaagat	ttccttacia	gaccatctgg	acaaagctaa	1440
gaaagacatt	acattttata	tgccagtaga	caatttggga	atggctgtta	ttgactggga	1500
agaatggaga	cccacttggg	caagaaactg	gaaacctaaa	gatgtttaca	agaataggtc	1560
tattgaattg	gttcagcaac	aaaatgtaca	acttagtctc	acagaggcca	ctgagaaagc	1620
aaaacaagaa	ttgaaaag	cagggaaagga	tttccctggt	gagactataa	aattgggaaa	1680
attacttcgg	ccaaatcact	tgtgggggta	ttatcttttt	ccggattggt	acaacctca	1740
ctataagaaa	cccggttaca	atggaagtg	cttcaatgta	gaaataaaaa	gaaatgatga	1800
tctcagctgg	ttgtggaatg	aaagcactgc	tctttacc	tccatttatt	tgaaactca	1860
gcagtctcct	gtagctgcta	cactctatgt	gogcaatcga	gttcgggaag	ccatcagagt	1920
ttccaaaata	cctgatgcaa	aaagtccact	tccggttttt	gcataatacc	gcatagtttt	1980
tactgatcaa	gttttgaaat	tcctttctca	agatgaactt	gtgtatacat	ttggcgaaac	2040
tgttgctctg	gggtgctctg	gaattgtaat	atggggaacc	ctcagtataa	tgcaagat	2100
gaaatcttgc	ttgctcctag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
cgtcacacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgccttgc	caggagcaag	gagtgtgtat	2220
aaggaaaaac	tggaattcaa	gtgactatct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgctattca	2280
acttgagaaa	ggtggaaagt	tcacagtagc	tggaaaaccg	acacttgaag	acctggagca	2340
atthtctgaa	aaatthtatt	gcagctgtta	tagcaccttg	agtttgaagg	agaaagctga	2400
tgtaaaagac	actgatgctg	ttgatgtgtg	tattgtgat	ggtgtctgta	tagatgcttt	2460
tctaaaacct	cccatggaga	cagaagaacc	tcaaattttc	tactgaggat	ccatagctaa	2520
cgccccctctc	cctccccccc	ccctaacggt	actggocgaa	gccgcttgg	ataaggccgg	2580
tgtgogtttg	tctatatggt	atthtccacc	atattgccgt	ctthtggcaa	tgtgagggcc	2640
cggaaacctg	gcctgtctt	cttgacgagc	attcctaggg	gtctthtccc	tctcgccaaa	2700
ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ttcttgaaga	2760
caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcggaaacc	ccccacctgg	cgacagggtc	2820
ctctgvcggc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggvcggcaca	acccaggtgc	2880
cacgttgtga	gttgatagt	tgtggaaaga	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgtattcaac	2940
aaggvgctga	aggatgccc	gaaggtaccc	cattgtatgg	gatctgatct	gggvcctcgg	3000
gtcacatgct	ttacatgtgt	ttagtvcagg	ttaaaaaaac	gtctaggccc	cccgaaccac	3060
ggggacgtgg	ttthtctttg	aaaaacacga	tgataagctt	gccacaacc	acagvcggccg	3120
ctgccatcat	ggttcgacca	ttgaaactgca	togtvcgctt	gtcccaaaat	atggggattg	3180
gcaagaacgg	agacctacc	tggcctccgc	tcaggaacga	gttcaagtac	ttccaaagaa	3240
tgaccacaac	ctcttcagtg	gaaggtaaac	agaatctggt	gattatgggt	aggaaaacct	3300
ggttctccat	tcctgagaag	aatvcacctt	taaaggacag	aattaatata	gttctcagta	3360
gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	atthtcttgc	caaaaagttg	gatgatgcct	3420
taagacttat	tgaacaaccg	gaattggcaa	gtaaagtga	catggtttgg	atagtcggag	3480
gcagttctgt	ttaccaggaa	gccatgaatc	aaccaggcca	cctcagactc	tttvtgacaa	3540
ggatcatgca	ggaattttaa	agtvcacctt	ttthtccaga	aattgatttg	gggaaatata	3600
aacttctccc	agaataccca	ggvcctctct	ctgaggtcca	ggagvaaaa	ggcatcaagt	3660

ataagtttga	agtctacgag	aagaaagact	aaacgcgtgg	tacctotaga	gtogacccgg	3720
gogggcgcct	cgagcagaca	tgataagata	cattgatgag	tttggacaaa	ccacaactag	3780
aatgcagtga	aaaaaatgct	ttatttgtga	aatttgtgat	gotattgott	tatttghtaac	3840
cattataagc	tgcaataaac	aagttaacaa	caacaattgc	attcatttta	tgtttcaggt	3900
tcagggggag	atgtgggagg	ttttttaaag	caagtaaaac	ctctacaaat	gtggtaaaat	3960
cgataaggat	ccgggctggc	gtaatagcga	agaggcccgc	accgatcgcc	cttcccaaca	4020
gttgccgagc	ctgaatggcg	aatggacgcg	ccctgtagcg	gcgcatlaag	cgcgggcgggt	4080
gtggtggtta	cgcgccagcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcc	cgctcctttc	4140
gctttcttcc	cttccctttct	cgccacgctc	gccggctttc	ccogtcaagc	totaaatcgg	4200
gggctccctt	tagggttccg	atthagtgct	ttacggcacc	togaccccaa	aaaacttgat	4260
taggggtgatg	gttcacgtag	tgggccatcg	ccctgataga	cggtttttcg	ccctttgacg	4320
ttggagtcca	cgttccttta	tagtggactc	ttgttccaaa	ctggaacaac	actcaaccct	4380
atctcggctct	attccttttga	tttataaggg	atthttgccga	tttoggccta	ttggttaaaa	4440
aatgagctga	tttaacaaaa	atttaacgcg	aattttaaca	aaatattaac	gcttacaatt	4500
tctgatgagc	gtattttctc	cttacgcctc	tgtgoggtat	ttcacacogc	atatggtgca	4560
ctctcagtac	aatctgctct	gatgccgcat	agttaagcca	gccccgacac	cgccaacac	4620
ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggctac	cgcttacaga	caagctgtga	4680
ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaccgctc	atcaccgaaa	cgcgcgagac	4740
gaaagggcct	cgtgatacgc	ctatttttat	aggttaatgt	catgataata	atggtttctt	4800
agacgtcagg	tggcactttt	cggggaaatg	tgcgcggaac	ccctatttgt	ttatttttct	4860
aaatacattc	aaatatgtat	ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	4920
attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	atthccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	4980
cggcattttg	ccttccctgtt	tttgctcacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	aaagatgctg	5040
aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	tcgaaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	5100
ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	5160
gtggcgcggt	attatcccggt	attgacgocg	ggcaagagca	actoggtogc	cgcatacact	5220
attctcagaa	tgacttggtt	gagtaactcc	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	5280
tgacagtaag	agaattatgc	agtgctgcca	taacctgag	tgataaact	gggccaact	5340
tacttctgac	aacgatcggg	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	5400
atcatgtaac	tcgccttgat	cgttgggaac	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaaocgacg	5460
agcgtgacac	cacgatgcct	gtagcaatgg	caacaacggt	gcgcaaaacta	ttaaactggcg	5520
aactacttac	tctagcttcc	cggaacaat	taatagactg	gatggaggcg	gataaagttg	5580
caggaccact	tctgcgctcg	gcccttccgg	ctggctgggt	tattgctgat	aaatctggag	5640
ccggtgagcg	tgggtctcgc	ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggt	aagccctccc	5700
gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	5760
tcgctgagat	aggtgcctca	ctgattaagc	attggtaaact	gtcagaccaa	gtttactcat	5820
atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	5880
tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	aacgtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	5940
accccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgocg	gtaactctgct	6000
gcttgcaaac	aaaaaacca	ccgctaccag	cggtggtttg	tttgccggat	caagagctac	6060
caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	actgttcttc	6120
tagtgtagcc	gtagttagge	caccacttca	agaactctgt	agcaccgcct	acatacctcg	6180
ctctgctaata	cctgttacc	gtggctgctg	ccagtgggca	taagtcgtgt	cttaccgggt	6240
tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	cgcagcggtc	gggctgaacg	gggggttcgt	6300
gcacacagcc	cagcttgag	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	6360
tatgagaaaag	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcgga	caggtatccg	gtaagcggca	6420
gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	6480
gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	6540
ggcggagcct	atggaaaaac	gocagcaacg	cgcccttttt	aoggttcctg	gccttttctg	6600
ggccttttgc	tcacatggct	cgacagatct				6630

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

<220>
 <223> dihidrofolato reductasa

<400> 53

ES 2 566 549 T3

```

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

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

```

5 <210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Marcador His
 <400> 54

His His His His His His
 1 5

15 <210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Marcador Flag
 <400> 55

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

30 <210> 56
 <211> 1449
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <223> Secuencia de ARNm de Gen2
 <400> 56

atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
 tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
 cctcctgta ttccaaatgt gcctttctctc tgggcctgga atgcccacag tgaattttgt 180
 cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccoga 240
 ataaacgcca cggggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
 tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
 caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatctt atatgocagt agacaatttg 420
 ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccocactt gggcaagaaa ctggaaacct 480

aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc acaaaaatgt acaacttagt 540
 ctccacagagg cactgagaa agcaaaaaca gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
 gttagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtggg ttattatctt 660
 tttccggatt gttacaacca tcaactataag aaaccocggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
 gtagaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
 coatccattt atttgaacac tcagcagctc cctgtagctg ctacactcta tgtgocgaat 840
 cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggtt 900
 tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
 cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatattggga 1020
 accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
 atactgaatc cttacataat caacgtcaca cttagcagcca aaatgtgtag tcaagtgtct 1140
 tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
 aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
 ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
 ttgagttgta aggagaaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
 gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
 ttctactga 1449

<210> 57

<211> 17

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> Péptido C-terminal escindicio a partir de los aa 431-447 de rHuPH20 soluble

<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

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

20 <223> Péptido C-terminal escindicio a partir de los aa 431-446 de rHuPH20 soluble

<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

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

30

ES 2 566 549 T3

<223> Péptido C-terminal escindicio a partir de los aa 431-445 de rHuPH20 soluble

<400> 59

5 **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

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Péptido C-terminal escindicio a partir de los aa 431-444 de rHuPH20 soluble

15 <400> 60

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

<210> 61

20 <211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

25 <223> Péptido C-terminal escindicio a partir de los aa 431-443 de rHuPH20 soluble

<400> 61

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

30 <210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <220>

<223> Péptido C-terminal escindicio a partir de los aa 431-442 de rHuPH20 soluble

<400> 62

40 <210> 63

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

<211> 520

45 <212> PRT

<213> *Ovis aries*

<400> 63

ES 2 566 549 T3

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

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

<210> 64
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

5

<220>
 <223> PH20

10

<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

ES 2 566 549 T3

<210> 65
<211> 517
<212> PRT
<213> *Ovis aries*

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												

ES 2 566 549 T3

<210> 66
 <211> 1620
 <212> DNA
 <213> *Ovis aries*

5

<400> 66

```

ttttccgtgt  tggttggctc  tggacttcag  agcaccocct  ctcatttcaa  acacttcttt  60
cctctgggcc  tggaatgccc  cagctgaacg  ttgtattaaa  atctttaaac  tacctccaga  120
tctgagactc  ttctctgtaa  aaggaagccc  ccaaaaaagt  gctacgggac  aatttattac  180
attatthtat  gctgatagac  ttggctacta  tcctcatata  gatgaaaaaa  caggcaacac  240
tgtatatgga  ggaattcccc  agttgggaaa  cttaaaaaat  catttgaaa   aagccaaaa   300
agacattgcc  tattacatac  caaatgacag  cgtgggcttg  gcggtcattg  actgggaaaa  360
ctggaggcct  acctgggcaa  gaaactggaa  acctaaagat  gtttacaggg  atgagtctgt  420
tgagttgggt  ctgcaaaaaa  atccacaact  cagtttccca  gaggcttcca  agattgcaa   480
agtggatttt  gagacagcag  gaaagagttt  catgcaagag  actttaaaac  tgggaaaatt  540
acttcggcca  aatcacttat  ggggttatta  tctttttcct  gattgttaca  atcataatta  600
taaccagcct  acttacaatg  gaaattgctc  tgatttagaa  aaaaggagaa  atgatgatct  660
cgactgggtg  tggaaagaaa  gcaactgcct  ttccctctc  gtttatttga  atatcaagtt  720
aaaatctact  ccaaaagctg  ccttctatgt  tcgtaatcgt  gtccaggaag  ccattcggtt  780
gtctaaaata  gcgagtggtg  aaagtccact  tcccgthttt  gtatatcacc  gtccagthtt  840
tactgatggg  tcttcaacat  acctttctca  gggtgacctt  gtgaattcgg  ttggtgagat  900
ggttgctcta  ggtgcctctg  ggattataat  gtggggcagt  ctcaatctaa  gcctaactat  960
gcaatcttgc  atgaacctag  gcaattactt  gaacactaca  ctgaatcctt  acataatcaa  1020
cgtcacccta  gcagccaaaa  tgtgcagcca  agtgctttgc  cacgatgaag  gagtgtgtac  1080
aaggaaacaa  tggaaattcaa  gogactatct  tcacctgaac  ccaatgaatt  ttgctattca  1140
aactgggaaa  ggtggaaaat  acacagtacc  tgggaaagtc  aacttgaag  acctgcaaac  1200
gttttctgat  aaatthtatt  gcagttgtta  tgccaacatc  aactgtaaga  agagagttga  1260
tataaaaaat  gttcatagtg  ttaatgtatg  tatggcagaa  gacatttgta  tagagggccc  1320
tgtgaagtta  caaccagtg  atcattcctc  tagccagaat  gaggcatact  ctaccaccgt  1380
cagcagtatc  tcacctcta  ctacagccac  cacagtatct  ccatgtactc  ctgagaaaca  1440
gtcccctgag  tgcctcaaag  tcaggtgtht  ggaagccatc  gccaacgtca  cccaaacggg  1500
gtgtcaaggt  gttaaatgga  agaacacttc  cagtcagtca  agtattcaa  atattaaaa  1560
tcaaacaacc  tattaataa  taaattcagt  gcttataaaa  aaaaaaaaa  aaaaaaaaa  1620
    
```

10

<210> 67
 <211> 793
 <212> PRT
 <213> *Arthrobacter* sp. (cepa FB24)

15

<220>
 <223> hialuronano liasa
 <400> 67

ES 2 566 549 T3

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

ES 2 566 549 T3

Ala Gln Ala Val Lys Phe Lys Lys Glu Lys Thr Thr Ala Ala Thr Phe
 690 695 700
 Trp Arg Pro Gly Thr Val Gly Asp Leu Ala Leu Ser Gly Pro Ala Cys
 705 710 715 720
 Val Val Val Lys Glu Val Gly Asp Arg Leu Ser Ile Ala Val Ser Asp
 725 730 735
 Pro Thr Gln Asn Ala Ser Thr Leu Thr Leu Arg Leu Lys Thr Lys Arg
 740 745 750
 Phe Phe Arg Ile Ile Glu Gly Gln Gly Ala Ser Leu Ser His Gly Ala
 755 760 765
 Asp Gly Phe Thr Val Leu Glu Val Asp Ile Ala Asn His Ala Gly Arg
 770 775 780
 Thr Lys Gln Ile Glu Leu Ser Ala Glu
 785 790

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

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<400> 68

ES 2 566 549 T3

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

Leu Ala Asp Asn Asp His Ile Ile Lys Glu Leu Thr Thr Ala Val Phe
 325 330 335
 Ala Ser Glu Ala Pro His Ile Thr Asp Phe Tyr Pro Ala Glu Lys Ile
 340 345 350
 Asp Leu Gly Arg Ala Lys Ala Gly Glu Gln Ile Phe Lys Asn Thr Cys
 355 360 365
 Ala Lys Cys His Gly His Tyr Glu Lys Ala Trp Asn Leu Pro Gln Ala
 370 375 380
 Leu Val Leu Ser Ala Ala Glu Arg Leu Lys Thr Val Glu Val Arg Tyr
 385 390 395 400
 Lys Glu Lys Thr Pro Val Val Asn Val Gly Thr Asp Pro Phe Arg Arg
 405 410 415
 Gln Gly Met Lys Ser Leu Glu Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ile Ser Lys
 420 425 430
 Lys Asn Gly Ile Val Ile Lys Ala Gln Glu Gly Tyr Val Pro Pro Pro
 435 440 445
 Leu Val Gly Ile Trp Ala Arg Trp Pro Tyr Met His Asn Asn Ser Ile
 450 455 460
 Pro Asn Leu Cys Val Leu Leu Thr Pro Ala Lys Lys Arg Pro Ser Ile
 465 470 475 480
 Tyr Tyr Ser Gly Glu Ala Leu Asn Lys Asp Thr Asp Tyr Asp Phe Ser
 485 490 495
 Cys Gly Gly Tyr Pro Ile Gly Asp Lys Thr Pro Lys Ala Trp Lys Thr
 500 505 510
 Arg Glu His Leu Tyr Asp Thr Arg Asn Pro Gly Met Gly Asn Met Gly
 515 520 525
 His Asp Glu Gly Ile Phe Ile Lys Asp Gly Lys Glu Ile Leu Ser Ala
 530 535 540
 Glu Asp Lys Tyr Asn Leu Ile Gln Phe Leu Gln Thr Leu
 545 550 555

<210> 69
 <211> 813
 <212> PRT
 <213> *Propionibacterium acnes*

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<400> 69

ES 2 566 549 T3

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

His Phe Ile Pro Asp Pro Trp Phe Gln Gln Pro Ala Ser Val Lys Pro
 195 200 205
 Thr Ala Asn Pro Val Gln Pro Val Val Ser Thr Gly Ala Asn Arg Met
 210 215 220
 Asp Leu Thr Arg Ala Val Met Cys Arg Ser Ile Ala Thr Gly Asp Glu
 225 230 235 240
 Lys Arg Leu Arg His Ala Val Asp Gly Leu Pro Asp Ala Trp Arg Val
 245 250 255
 Thr Thr Glu Gly Asp Gly Phe Arg Ala Asp Gly Gly Phe Ile Gln His
 260 265 270
 Ser His Ile Pro Tyr Thr Gly Gly Tyr Gly Asp Val Leu Phe Ser Gly
 275 280 285
 Leu Ala Met Leu Phe Pro Leu Val Ser Gly Met Arg Phe Asp Ile Val
 290 295 300
 Glu Ser Ala Arg Lys Ala Phe His Asp Gln Val Glu Arg Gly Phe Ile
 305 310 315 320
 Pro Val Met Tyr Asn Gly Gln Ile Leu Asp Asp Val Arg Gly Arg Ser
 325 330 335
 Ile Ser Arg Ile Asn Glu Ser Ala Ala Met His Gly Ile Ser Ile Ala
 340 345 350
 Arg Ala Met Leu Met Met Ala Asp Ala Leu Pro Thr His Arg Ala Glu
 355 360 365
 Gln Trp Arg Gly Ile Val His Gly Trp Met Ala Arg Asn Thr Phe Asp
 370 375 380
 His Leu Ser Glu Pro Ser Thr Leu Val Asp Ile Ser Leu Phe Asp Ala
 385 390 395 400
 Ala Ala Lys Ala Arg Pro Val Pro Glu Ser Ser Thr Pro Ser Tyr Phe
 405 410 415
 Ala Ser Met Asp Arg Leu Val His Arg Thr Ala Asp Trp Leu Ile Thr
 420 425 430
 Val Ser Asn Cys Ser Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Glu Tyr Gly Asn Gly
 435 440 445
 Glu Asn Glu Trp Ala Ser Arg Thr Ser Gln Gly Met Arg Tyr Leu Leu
 450 455 460
 Leu Pro Gly Asp Met Gly Gln Tyr Glu Asp Gly Tyr Trp Ala Thr Val
 465 470 475 480
 Asp Tyr Ser Ala Pro Thr Gly Thr Thr Val Asp Ser Thr Pro Leu Lys
 485 490 495
 Arg Ala Val Gly Ala Ser Trp Ala Ala Lys Thr Pro Thr Asn Glu Trp
 500 505 510
 Ser Gly Gly Leu Ala Ser Gly Ser Trp Ser Ala Ala Ala Ser His Ile
 515 520 525
 Thr Ser Gln Asp Ser Ala Leu Lys Ala Arg Arg Leu Trp Val Gly Leu
 530 535 540
 Lys Asp Ala Met Val Glu Leu Thr Thr Asp Val Thr Thr Asp Ala Ser
 545 550 555 560
 Arg Ala Ile Thr Val 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

ES 2 566 549 T3

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*

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<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

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> 71
 <211> 1072
 5 <212> PRT
 <213> *Streptococcus agalactiae* 18RS21

<220>
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 71

ES 2 566 549 T3

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
				70						75					80
Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	His	Ser	Thr	Met	Lys	Gln	Val	Val	Asp	Asn	Gln
				85					90					95	
Thr	Gln	Asn	Lys	Glu	Leu	Val	Lys	Asn	Gly	Asp	Phe	Asn	Gln	Thr	Asn
			100					105					110		
Pro	Val	Ser	Gly	Ser	Trp	Ser	His	Thr	Ser	Ala	Arg	Glu	Trp	Ser	Ala
		115					120						125		
Trp	Ile	Asp	Lys	Glu	Asn	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Pro	Ile	Ile	Gln	Arg
	130					135					140				
Thr	Glu	Gln	Gly	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Ser	Asp	Lys	Gly	Phe	Arg	Gly
	145				150					155					160
Ala	Val	Thr	Gln	Lys	Val	Asn	Ile	Asp	Pro	Thr	Lys	Lys	Tyr	Glu	Val
				165					170					175	
Lys	Phe	Asp	Ile	Glu	Thr	Ser	Asn	Lys	Ala	Gly	Gln	Ala	Phe	Leu	Arg
			180					185					190		
Ile	Met	Glu	Lys	Lys	Asp	Asn	Asn	Thr	Arg	Leu	Trp	Leu	Ser	Glu	Met
		195					200						205		

Thr Ser Gly Thr Thr Asn Lys His Thr Leu Thr Lys Ile Tyr Asn Pro
 210 215 220
 Lys Leu Asn Val Ser Glu Val Thr Leu Glu Leu Tyr Tyr Glu Lys Gly
 225 230 235 240
 Thr Gly Ser Ala Thr Phe Asp Asn Ile Ser Met Lys Ala Lys Gly Pro
 245 250 255
 Lys Asp Ser Glu His Pro Gln Pro Val Thr Thr Gln Ile Glu Glu Ser
 260 265 270
 Val Asn Thr Ala Leu Asn Lys Asn Tyr Val Phe Asn Lys Ala Asp Tyr
 275 280 285
 Gln Tyr Thr Leu Thr Asn Pro Ser Leu Gly Lys Ile Val Gly Gly Ile
 290 295 300
 Leu Tyr Pro Asn Ala Thr Gly Ser Thr Thr Val Lys Ile Ser Asp Lys
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Ile Ile Lys Glu Val Pro Leu Ser Val Thr Ala Ser Thr
 325 330 335
 Glu Asp Lys Phe Thr Lys Leu Leu Asp Lys Trp Asn Asp Val Thr Ile
 340 345 350
 Gly Asn His Val Tyr Asp Thr Asn Asp Ser Asn Met Gln Lys Ile Asn
 355 360 365
 Gln Lys Leu Asp Glu Thr Asn Ala Lys Asn Ile Lys Thr Ile Lys Leu
 370 375 380
 Asp Ser Asn His Thr Phe Leu Trp Lys Asp Leu Asp Asn Leu Asn Asn
 385 390 395 400
 Ser Ala Gln Leu Thr Ala Thr Tyr Arg Arg Leu Glu Asp Leu Ala Lys
 405 410 415
 Gln Ile Thr Asn Pro His Ser Thr Ile Tyr Lys Asn Glu Lys Ala Ile
 420 425 430
 Arg Thr Val Lys Glu Ser Leu Ala Trp Leu His Gln Asn Phe Tyr Asn
 435 440 445
 Val Asn Lys Asp Ile Glu Gly Ser Ala Asn Trp Trp Asp Phe Glu Ile
 450 455 460
 Gly Val Pro Arg Ser Ile Thr Ala Thr Leu Ala Leu Met Asn Asn Tyr
 465 470 475 480
 Phe Thr Asp Ala Glu Ile Lys Thr Tyr Thr Asp Pro Ile Glu His Phe
 485 490 495
 Val Pro Asp Ala Gly Tyr Phe Arg Lys Thr Leu Asp Asn Pro Phe Lys
 500 505 510
 Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val Asp Met Gly Arg Val Lys Ile Ile Glu
 515 520 525
 Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asn Thr Ile Ile Glu Lys Thr Ser His Ser
 530 535 540
 Leu Lys Asn Leu Phe Thr Thr Ala Thr Lys Ala Glu Gly Phe Tyr Ala
 545 550 555 560
 Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Thr Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr
 565 570 575
 Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly Leu Thr Gln Leu Leu Pro Ile Ile Gln
 580 585 590
 Glu Thr Asp Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Glu Leu Asp Met Val Tyr Lys
 595 600 605
 Trp Ile Asn Gln Ser Phe Leu Pro Leu Ile Val Lys Gly Glu Leu Met
 610 615 620
 Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Glu Ala Ala Ser Ser His
 625 630 635 640
 Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Phe Leu Arg Leu Ala Asn Met
 645 650 655
 Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Asp Leu Ile Ser Thr Ile Lys Thr Ile
 660 665 670
 Ile Thr Ser Asn Lys Phe Tyr Asn Val Phe Asn Asn Leu Lys Ser Tyr
 675 680 685
 Ser Asp Ile Ala Asn Met Asn Lys Met Leu Asn Asp Ser Thr Val Ala
 690 695 700
 Thr Lys Pro Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr Phe Asn Ser Met Asp Arg
 705 710 715 720
 Leu Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Lys Asp Phe Gly Phe Ala Leu Ser Leu

				725					730				735		
His	Ser	Lys	Arg	Thr	Leu	Asn	Tyr	Glu	Gly	Met	Asn	Asp	Glu	Asn	Thr
			740					745					750		
Arg	Gly	Trp	Tyr	Thr	Gly	Asp	Gly	Met	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asp
		755					760					765			
Gln	Ser	His	Tyr	Ser	Asn	His	Phe	Trp	Pro	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Lys
	770				775						780				
Met	Ala	Gly	Thr	Thr	Glu	Lys	Asp	Ala	Lys	Arg	Glu	Asp	Thr	Thr	Lys
785					790					795					800
Glu	Phe	Met	Ser	Lys	His	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Gln
				805					810					815	
Val	Thr	Gly	Thr	Ser	Asp	Phe	Val	Gly	Ser	Val	Lys	Leu	Asn	Asp	His
			820					825					830		
Phe	Ala	Leu	Ala	Ala	Met	Asp	Phe	Thr	Asn	Trp	Asp	Arg	Thr	Leu	Thr
		835					840					845			
Ala	Gln	Lys	Gly	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val	Phe	Leu	Gly
	850					855					860				
Ser	Asn	Ile	Lys	Asn	Thr	Asn	Gly	Ile	Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Thr	Ile
865				870						875					880
Asp	Gln	Arg	Lys	Asp	Asp	Ser	Lys	Thr	Pro	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Val	Asn
				885					890					895	
Gly	Lys	Thr	Ile	Asp	Leu	Lys	Gln	Ala	Ser	Ser	Gln	Gln	Phe	Thr	Asp
			900					905					910		
Thr	Lys	Ser	Val	Phe	Leu	Glu	Ser	Lys	Glu	Pro	Gly	Arg	Asn	Ile	Gly
		915						920				925			
Tyr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asn	Ser	Thr	Ile	Asp	Ile	Glu	Arg	Lys	Glu	Gln
	930					935					940				
Thr	Gly	Thr	Trp	Asn	Ser	Ile	Asn	Arg	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Ile
945				950							955				960
Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Ile	Thr	Ile	Ser	Gln	Lys	His	Asp	Asn	Lys	Gly
				965					970					975	
Asp	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Met	Met	Val	Pro	Asn	Ile	Asp	Arg	Thr	Ser	Phe
			980					985					990		
Asp	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser	Lys	Glu	Val	Glu	Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser
		995					1000					1005			
Lys	Gln	Gln	Val	Ile	Tyr	Asp	Lys	Asn	Ser	Gln	Thr	Trp	Ala	Val	Ile
	1010					1015					1020				
Lys	His	Asp	Asn	Gln	Glu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asn	Gln	Phe	Lys	Met	Asn
1025					1030					1035					1040
Lys	Ala	Gly	Leu	Tyr	Leu	Val	Gln	Lys	Val	Gly	Asn	Asp	Tyr	Gln	Asn
				1045						1050				1055	
Val	Tyr	Tyr	Gln	Pro	Gln	Thr	Met	Thr	Lys	Thr	Asp	Gln	Leu	Ala	Ile
			1060					1065					1070		

<210> 72
 <211> 1081
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus agalactiae* serotipo Ia

<220>
 <223> hialuronano liasa

<400> 72

ES 2 566 549 T3

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

				85					90				95		
Thr	Gln	Asn	Lys	Glu	Leu	Val	Lys	Asn	Gly	Asp	Phe	Lys	Glu	Lys	Ile
			100					105					110		
Ile	Asp	Lys	Lys	Ile	Asp	Lys	Lys	Ser	Gln	Trp	Thr	Asn	Leu	Tyr	Gly
		115					120					125			
Ala	Lys	Asp	Trp	Asn	Thr	Tyr	Ile	Asp	Gln	Thr	Lys	Ser	Val	Asn	Lys
		130					135				140				
Ser	Pro	Ile	Ile	Gln	Arg	Thr	Glu	Gln	Gly	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Ser
145					150					155					160
Asp	Lys	Gly	Phe	Arg	Gly	Ala	Val	Thr	Gln	Lys	Val	Asn	Ile	Asp	Pro
			165						170					175	
Thr	Lys	Lys	Tyr	Glu	Val	Lys	Phe	Asp	Ile	Glu	Thr	Ser	Asn	Lys	Val
			180					185					190		
Gly	Gln	Ala	Phe	Leu	Arg	Ile	Met	Lys	Lys	Lys	Asp	Lys	Asn	Thr	Arg
		195					200					205			
Leu	Trp	Leu	Ser	Glu	Met	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Lys	His	Thr	Leu
		210				215					220				
Thr	Lys	Ile	Tyr	Asn	Pro	Lys	Leu	Asn	Val	Ser	Glu	Val	Thr	Leu	Glu
225				230						235					240
Leu	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Gly	Thr	Gly	Ser	Val	Thr	Phe	Asp	Asn	Ile	Ser
				245						250					255
Met	Lys	Ala	Lys	Gly	Pro	Lys	Asp	Ser	Glu	His	Pro	Gln	Pro	Val	Thr
		260						265					270		
Thr	Gln	Ile	Glu	Glu	Ser	Val	Asn	Thr	Ala	Leu	Asn	Lys	Asn	Tyr	Val
		275					280						285		
Phe	Asn	Lys	Ala	Asp	Tyr	Gln	Tyr	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Ser	Leu	Gly
		290				295					300				
Lys	Ile	Val	Gly	Gly	Ile	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ala	Thr	Gly	Ser	Thr	Thr
305					310					315					320
Val	Lys	Ile	Ser	Asp	Lys	Ser	Gly	Lys	Ile	Ile	Lys	Glu	Val	Pro	Leu
				325						330				335	
Ser	Val	Thr	Ala	Ser	Thr	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu	Leu	Asp	Lys
			340					345					350		
Trp	Asn	Asp	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	His	Val	Tyr	Asp	Thr	Asn	Asp	Ser
		355					360					365			
Asn	Met	Gln	Lys	Leu	Asn	Gln	Lys	Leu	Asp	Glu	Thr	Asn	Ala	Lys	Asn
		370				375					380				
Ile	Lys	Asp	Ile	Lys	Leu	Asp	Ser	Asn	Arg	Thr	Phe	Leu	Trp	Glu	Asp
385				390					395						400
Leu	Lys	Gly	Leu	Asn	Ser	Ala	Gln	Leu	Thr	Ala	Thr	Tyr	Arg	Arg	
				405					410					415	
Leu	Glu	Asp	Leu	Ala	Lys	Gln	Ile	Thr	Asn	Pro	His	Ser	Thr	Ile	Tyr
			420					425					430		
Lys	Asn	Glu	Lys	Ala	Ile	Arg	Thr	Val	Lys	Glu	Ser	Leu	Ala	Trp	Leu
		435					440						445		
His	Gln	Asn	Phe	Tyr	Asn	Val	Asn	Lys	Asp	Ile	Glu	Gly	Ser	Ala	Asn
		450				455					460				
Trp	Trp	Asp	Phe	Glu	Ile	Gly	Val	Pro	Arg	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Leu
465					470					475					480
Ala	Leu	Met	Asn	Asn	Tyr	Phe	Thr	Asp	Ala	Glu	Ile	Lys	Thr	Tyr	Thr
				485					490					495	
Asp	Pro	Ile	Glu	His	Phe	Val	Pro	Asp	Ala	Gly	Tyr	Phe	Arg	Lys	Thr
			500					505					510		
Leu	Val	Asn	Pro	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Gly	Asn	Leu	Val	Asp	Met	Gly
		515					520					525			
Arg	Val	Lys	Ile	Ile	Glu	Gly	Leu	Leu	Arg	Lys	Asp	Asn	Thr	Ile	Ile
		530				535					540				
Lys	Lys	Thr	Ser	His	Ser	Leu	Lys	Asn	Leu	Phe	Thr	Thr	Ala	Thr	Lys
545					550					555					560
Ala	Glu	Gly	Phe	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Thr	Asn	Val
				565					570					575	
Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Thr	Gln
			580				585						590		
Leu	Leu	Pro	Ile	Ile	Gln	Glu	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Gln	Glu
		595					600						605		

Leu Asp Met Val Tyr Lys Trp Ile Asn Gln Ser Phe Leu Pro Leu Ile
 610 615 620
 Val Lys Gly Glu Leu Met Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg
 625 630 635 640
 Glu Ala Ala Ser Ser His Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Arg Gly Phe
 645 650 655
 Leu Arg Leu Ala Asn Met Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Asp Leu Lys
 660 665 670
 Ser Thr Ile Lys Thr Ile Ile Thr Ser Asn Lys Phe Tyr Asn Val Phe
 675 680 685
 Asn Asn Leu Lys Ser Tyr Ser Asp Ile Ala Asn Met Asn Lys Leu Leu
 690 695 700
 Asn Asp Ser Thr Val Ala Thr Lys Pro Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr
 705 710 715 720
 Phe Asn Ser Met Asp Arg Leu Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Lys Asp Phe
 725 730 735
 Gly Phe Ala Leu Ser Leu His Ser Lys Arg Thr Leu Asn Tyr Glu Gly
 740 745 750
 Met Asn Asp Glu Asn Thr Arg Gly Trp Tyr Thr Gly Asp Gly Met Phe
 755 760 765
 Tyr Leu Tyr Asn Ser Asp Gln Ser His Tyr Ser Asn His Phe Trp Pro
 770 775 780
 Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Ala Gly Thr Thr Glu Lys Asp Thr Gly
 785 790 795 800
 Arg Glu Asp Thr Ile Lys Lys Leu Met Asn Arg Tyr Asp Lys Thr Asn
 805 810 815
 Lys Asn Ser Lys Val Met Thr Gly Gln Val Thr Gly Thr Ser Asp Phe
 820 825 830
 Val Gly Ser Val Lys Leu Asn Asp His Phe Ala Leu Ala Ala Met Asp
 835 840 845
 Phe Thr Asn Trp Asp Arg Thr Leu Thr Ala Gln Lys Gly Trp Val Ile
 850 855 860
 Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly Ser Asn Ile Lys Asn Thr Asn
 865 870 875 880
 Gly Val Gly Asn Val Ser Thr Thr Ile Asp Gln Arg Lys Asp Asp Ser
 885 890 895
 Lys Thr Pro Tyr Thr Thr Tyr Val Asn Gly Lys Thr Val Asp Leu Lys
 900 905 910
 Gln Ala Ser Ser Gln Gln Phe Thr Asp Thr Lys Ser Val Phe Leu Glu
 915 920 925
 Ser Lys Glu Pro Gly Arg Asn Ile Gly Tyr Ile Phe Phe Lys Asn Ser
 930 935 940
 Thr Ile Asp Ile Glu Arg Lys Glu Gln Thr Gly Thr Trp Asn Ser Ile
 945 950 955 960
 Asn Arg Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ile Val Ser Asn Pro Phe Ile Thr
 965 970 975
 Ile Ser Gln Lys His Asp Asn Lys Gly Asp Ser Tyr Gly Tyr Met Met
 980 985 990
 Val Pro Asn Ile Asp Arg Thr Ser Phe Asp Lys Leu Ala Asn Ser Lys
 995 1000 1005
 Glu Val Glu Leu Leu Glu Asn Ser Ser Lys Gln Gln Val Ile Tyr Asp
 1010 1015 1020
 Lys Asn Ser Gln Thr Trp Ala Val Ile Lys His Asp Asn Gln Glu Ser
 1025 1030 1035 1040
 Leu Ile Asn Asn Gln Phe Lys Met Asn Lys Ala Gly Leu Tyr Leu Val
 1045 1050 1055
 Gln Lys Val Gly Asn Asp Tyr Gln Asn Val Tyr Tyr Gln Pro Gln Thr
 1060 1065 1070
 Met Thr Lys Thr Asp Gln Leu Ala Ile
 1075 1080

<210> 73
<211> 984
<212> PRT
<213> *Streptococcus agalactiae* serotipo III

5

<220>
<223> hialuronano liasa

10

<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	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	Glu	Asn	Ser	Ser	Lys	Gln	Gln	Val	Ile	Tyr	Asp	Lys		
		915					920						925			
Asn	Ser	Gln	Thr	Trp	Ala	Val	Ile	Lys	His	Asp	Asn	Gln	Glu	Ser	Leu	
		930				935							940			
Ile	Asn	Asn	Gln	Phe	Lys	Met	Asn	Lys	Ala	Gly	Leu	Tyr	Leu	Val	Gln	
945					950					955					960	
Lys	Val	Gly	Asn	Asp	Tyr	Gln	Asn	Val	Tyr	Tyr	Gln	Pro	Gln	Thr	Met	
				965						970					975	
Thr	Lys	Thr	Asp	Gln	Leu	Ala	Ile									
			980													

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

5

<220>
<223> hialuronano liasa

10

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

<220>
 <223> hialuronano liasa

<400> 75

5

10

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)

ES 2 566 549 T3

<220>

<223> hialuronano liasa

<400> 76

5

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

Tyr Glu Lys Leu Lys Lys Thr Trp Leu Asp Val Asn Tyr Gly Tyr Asp
 50 55 60
 Gln Tyr Asp Glu Asn Asn Gln Asp Met Lys Lys Lys Phe Asp Ala Lys
 65 70 75 80
 Glu Lys Glu Ala Lys Lys Leu Leu Asp Asp Met Lys Thr Asp Thr Asn
 85 90 95
 Arg Thr Tyr Leu Trp Ser Gly Ala Glu Asn Leu Glu Thr Asn Ser Ser
 100 105 110
 His Met Thr Lys Thr Tyr Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ala Glu Ser Met
 115 120 125
 Gln His Lys Asn Thr Val Leu Lys Thr Val Glu Asn Lys Leu Lys Ile
 130 135 140
 Lys Glu Ala Leu Asp Trp Met His Lys Asn Val Tyr Gly Lys Asn Pro
 145 150 155 160
 Ser Gln Lys Val Glu Asp Leu Thr Lys Asn Arg Lys Gly Gln Thr Thr
 165 170 175
 Pro Lys Asn Asn Ser Leu Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro
 180 185 190
 Arg Ala Leu Thr Asn Thr Leu Leu Leu Met Asp Asp Met Leu Thr Lys
 195 200 205
 Asp Glu Met Lys Asn Tyr Ser Lys Pro Ile Ser Thr Tyr Ala Pro Ser
 210 215 220
 Ser Asp Lys Ile Leu Ser Ser Val Gly Glu Ser Glu Asp Ala Lys Gly
 225 230 235 240
 Gly Asn Leu Val Asp Ile Ser Lys Val Lys Leu Leu Glu Ser Val Ile
 245 250 255
 Glu Glu Asp Val Asp Met Leu Lys Lys Ser Ile Asp Ser Phe Asn Lys
 260 265 270
 Val Phe Thr Tyr Val Gln Asp Ser Ala Thr Gly Lys Gly Arg Asn Gly
 275 280 285
 Phe Tyr Lys Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Gln Asp Val Pro Tyr Thr
 290 295 300
 Gly Ala Tyr Gly Val Val Leu Leu Glu Gly Ile Ser 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 Arg Leu Asn
 370 375 380
 Asp Thr Met Asp Asp Ser Thr Lys Thr Arg Tyr Lys Gln Ile Val Lys
 385 390 395 400
 Thr Ser Val Asn Ser Asp Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Asn
 405 410 415
 Ser Tyr Ser Asp Ile Ala Lys Met Lys Lys Leu Met Asn Asp Ser Thr
 420 425 430
 Ile Ser Lys Asn Asp Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met
 435 440 445
 Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu
 450 455 460
 Ser Met Thr Ser Lys Asn Ile Ala Arg Tyr Glu Asn Ile Asn Gly Glu
 465 470 475 480
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn
 485 490 495
 Ser Asp Val Lys His Tyr Arg Asp Asn Phe Trp Ala Thr Ala Asp Met
 500 505 510
 Thr Cys Leu Pro Gly Thr Thr Thr Leu Asn Asp Met Pro Ser Thr Asn
 515 520 525
 Thr Lys Asn Asp Lys Ser Phe Val Gly Gly Thr Lys Leu Asn Asn Lys
 530 535 540
 Tyr Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys Thr Leu Thr
 545 550 555 560
 Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val Phe Leu Gly

				565					570				575		
Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro	Val	Thr	Ser	Val
			580					585					590		
Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Lys	Leu	Phe	Lys	Asp	Asp	Ile	Glu
		595					600					605			
Ile	Thr	Thr	Ser	Asp	Val	Asn	Ala	Gln	Glu	Thr	His	Ser	Val	Phe	Leu
	610					615					620				
Glu	Ser	Asn	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	Asp	Lys
625					630					635					640
Pro	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	Ser	Glu
				645						650					655
Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Lys	Asp	Asp	Lys	Lys	Asp	Glu	Tyr	Tyr	Glu
			660					665					670		
Val	Thr	Gln	Thr	His	Asn	Thr	Ser	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Val	Leu
		675					680					685			
Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Ser	Asp	Phe	Lys	Ser	Lys	Asn	Asn	Asn	Val
	690					695					700				
Ser	Ile	Val	Lys	Gln	Asp	Glu	Asp	Phe	His	Val	Ile	Lys	Asp	Asn	Asp
705					710					715					720
Gly	Val	Phe	Ala	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asn	Thr	Lys	Ser	Phe	Asp
				725					730						735
Ile	Asn	Gly	Ile	Thr	Val	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Gly	Met	Phe	Val	Ile
			740					745					750		
Lys	Lys	Lys	Asp	Asp	Lys	Ala	Tyr	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro	Glu
		755					760					765			
Thr	Thr	Asn	Thr	Ala	Ser	Asn	Ile	Glu	Ser	Lys	Ile	Phe	Ile	Lys	Gly
	770					775					780				
Tyr	Thr	Ile	Thr	Asn	Lys	Ser	Val	Ile	Asn	Ser	Asn	Asp	Ala	Gly	Val
785					790					795					800
Asn	Phe	Glu	Leu	Thr	Lys										
				805											

<210> 77
 <211> 815
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus* (cepa MSSA476)

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<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	Ser
				165					170					175	
Arg	Asn	Thr	Asn	Leu	Asn	Trp	Trp	Asp	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro	Arg

			180						185				190			
Ala	Leu	Thr	Asn	Thr	Leu	Ile	Leu	Leu	Asn	Asp	Gln	Phe	Ser	Asn	Asp	
			195				200					205				
Glu	Lys	Lys	Lys	Tyr	Thr	Ala	Pro	Ile	Lys	Thr	Phe	Ala	Pro	Glu	Ser	
	210					215					220					
Asp	Lys	Ile	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	Gln	Pro	Glu	Gln	Ala	Lys	Gly	Gly	
	225					230				235					240	
Asn	Leu	Val	Asp	Ile	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Ile	Ile	Glu	
			245						250					255		
Glu	Asp	Lys	Asp	Ile	Thr	Lys	Asn	Ser	Ile	Asp	Ala	Phe	Asn	Lys	Val	
			260					265					270			
Phe	Thr	Tyr	Val	Gln	Ser	Asn	Ala	Thr	Gly	Lys	Glu	Arg	Asn	Gly	Phe	
		275					280					285				
Tyr	Lys	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	His	Gln	Asp	Val	Pro	Tyr	Thr	Gly	
	290					295					300					
Ala	Tyr	Gly	Val	Val	Leu	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser	Gln	Met	Met	Pro	Met	
	305				310					315					320	
Ile	Lys	Glu	Thr	Pro	Phe	Asn	Asp	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Thr	Thr	Leu	
			325						330					335		
Lys	Ser	Trp	Ile	Asp	Asp	Gly	Phe	Met	Pro	Leu	Ile	Tyr	Lys	Gly	Glu	
			340					345					350			
Met	Met	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Ala	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Glu	Thr	
		355				360						365				
Ser	His	Thr	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Ser	
	370					375					380					
Asp	Ala	Met	Asp	Asp	Ser	Thr	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Gln	Ile	Val	Lys	
	385				390					395					400	
Thr	Ser	Val	Lys	Ser	Asp	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Asp	Thr	Leu	Ser	
			405						410					415		
Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Ser	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Met	Glu	Asp	Ser	Thr	
			420					425					430			
Ile	Ser	Thr	Asn	Gly	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp	Met	
		435					440						445			
Asp	Arg	Val	Thr	Tyr	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	
	450					455					460					
Ser	Met	Thr	Ser	Lys	Asn	Val	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ser	Ile	Asn	Gly	Glu	
	465				470					475					480	
Asn	Leu	Lys	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Asn	
			485						490					495		
Ser	Asp	Val	Lys	His	Tyr	Arg	Asp	Asn	Phe	Trp	Ala	Thr	Ala	Asp	Met	
		500						505					510			
Lys	Arg	Leu	Ala	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Glu	Glu	Pro	Lys	Gly	
		515					520						525			
Thr	Asp	Val	Lys	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Phe	Val	Gly	Gly	Thr	Lys	Phe	
	530						535					540				
Asp	Asp	Gln	His	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Asp	Lys	
	545				550					555					560	
Thr	Leu	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val	
			565						570					575		
Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro	Val	
			580					585					590			
Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Thr	Asp	
		595					600						605			
Asp	Lys	Gln	Thr	Thr	Ala	Ser	Asp	Asn	Gln	Gly	Thr	Asn	Ser	Val	Phe	
	610					615					620					
Leu	Glu	Ser	Thr	Asn	Lys	Pro	Lys	Asn	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	
	625				630					635					640	
Asn	Glu	Ser	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	
			645						650					655		
Ser	Asp	Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Gln	Asp	Ser	Lys	Thr	Asn	Gln	Tyr	
			660					665					670			
Tyr	Glu	Val	Thr	Gln	Lys	His	Ser	Asn	Thr	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Tyr	
		675					680						685			
Val	Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Asp	Asp	Phe	Asn	Thr	Lys	Lys	Asp	
	690					695						700				

ES 2 566 549 T3

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)

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<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	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
 Lys Ser Trp Ile Asp Asp Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Glu
 340 345
 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

ES 2 566 549 T3

<210> 79
<211> 809
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus* (cepa bovina RF122)

5

<220>
<223> hialuronano liasa

10

<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

ES 2 566 549 T3

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

ES 2 566 549 T3

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)

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<400> 81

ES 2 566 549 T3

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
 385 390 400
 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

ES 2 566 549 T3

				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
							790				795				800
Val	His	Phe	Glu	Leu	Thr	Lys									
				805											

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

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<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 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

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
 5 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pneumoniae* (cepa ATCC BAA-255/R6)

<220>
 <223> hialuronano liasa

10 <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 Ile Lys
 435 440 445
 Lys Tyr Thr Asp Val Ile Glu Lys Phe Val Pro Asp Pro Glu His Phe
 450 455 460
 Arg Lys Thr Thr Asp Asn Pro Phe Lys Ala Leu Gly Gly Asn Leu Val
 465 470 475 480
 Asp Met Gly Arg Val Lys Val Ile Ala Gly Leu Leu Arg Lys Asp Asp
 485 490 495
 Gln Glu Ile Ser Ser Thr Ile Arg Ser Ile Glu Gln Val Phe Lys Leu
 500 505 510
 Val Asp Gln Gly Glu Gly Phe Tyr Gln Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His
 515 520 525
 Thr Asn Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Asp Gly
 530 535 540
 Leu Ser Gln Leu Leu Pro Val Ile Gln Lys Thr Lys Asn Pro Ile Asp
 545 550 555 560
 Lys Asp Lys Met Gln Thr Met Tyr His Trp Ile Asp Lys Ser Phe Ala
 565 570 575
 Pro Leu Leu Val Asn Gly Glu Leu Met Asp Met Ser Arg Gly Arg Ser
 580 585 590
 Ile Ser Arg Ala Asn Ser Glu Gly His Val Ala Ala Val Glu Val Leu
 595 600 605
 Arg Gly Ile His Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu Gly Glu Thr Lys Gln
 610 615 620
 Arg Leu Gln Ser Leu Val Lys Thr Ile Val Gln Ser Asp Ser Tyr Tyr
 625 630 635 640
 Asp Val Phe Lys Asn Leu Lys Thr Tyr Lys Asp Ile Ser Leu Met Gln
 645 650 655
 Ser Leu Leu Ser Asp Ala Gly Val Ala Ser Val Pro Arg Thr Ser Tyr
 660 665 670
 Leu Ser Ala Phe Asn Lys Met Asp Lys Thr Ala Met Tyr Asn Ala Glu
 675 680 685
 Lys Gly Phe Gly Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser Ser Arg Thr Leu Asn
 690 695 700
 Tyr Glu His Met Asn Lys Glu Asn Lys Arg Gly Trp Tyr Thr Ser Asp
 705 710 715 720
 Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Gly Asp Leu Ser His Tyr Ser Asp Gly
 725 730 735
 Tyr Trp Pro Thr Val Asn Pro Tyr Lys Met Pro Gly Thr Thr Glu Thr

				740						745					750
Asp	Ala	Lys	Arg	Ala	Asp	Ser	Asp	Thr	Gly	Lys	Val	Leu	Pro	Ser	Ala
		755					760					765			
Phe	Val	Gly	Thr	Ser	Lys	Leu	Asp	Asp	Ala	Asn	Ala	Thr	Ala	Thr	Met
	770					775					780				
Asp	Phe	Thr	Asn	Trp	Asn	Gln	Thr	Leu	Thr	Ala	His	Lys	Ser	Trp	Phe
785					790						795				800
Met	Leu	Lys	Asp	Lys	Ile	Ala	Phe	Leu	Gly	Ser	Asn	Ile	Gln	Asn	Thr
				805					810					815	
Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Ile	Asp	Gln	Arg	Lys	Leu	Glu	Ser
			820					825					830		
Ser	Asn	Pro	Tyr	Lys	Val	Tyr	Val	Asn	Asp	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Thr
		835					840					845			
Glu	Gln	Glu	Lys	Asp	Tyr	Pro	Glu	Thr	Gln	Ser	Val	Phe	Leu	Glu	Ser
	850					855					860				
Ser	Asp	Ser	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	Phe	Phe	Phe	Lys	Lys	Ser	Ser
865					870				875						880
Ile	Ser	Met	Ser	Lys	Ala	Leu	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				960
Gln	Gly	Val	Trp	Gly	Ile	Val	Lys	Tyr	Asp	Asp	Ser	Val	Ser	Thr	Ile
				965					970						975
Ser	Asn	Gln	Phe	Gln	Val	Leu	Lys	Arg	Gly	Val	Tyr	Thr	Ile	Arg	Lys
			980					985					990		
Glu	Gly	Asp	Glu	Tyr	Lys	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Glu	Thr	Gln	Glu
		995					1000					1005			
Ser	Ala	Pro	Asp	Gln	Glu	Val	Phe	Lys	Lys	Leu	Glu	Gln	Ala	Ala	Gln
	1010					1015					1020				
Pro	Gln	Val	Gln	Asn	Ser	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	Glu	Glu	Glu	Lys
1025					1030						1035				1040
Asn	His	Ser	Asp	Gln	Lys	Asn	Leu	Pro	Gln	Thr	Gly	Glu	Gly	Gln	Ser
				1045					1050					1055	
Ile	Leu	Ala	Ser	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Phe	Tyr	Leu	Phe
			1060					1065					1070		
Arg	Arg	Gly	Lys	Asn	Asn										
		1075													

<210> 84
 <211> 1067
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pneumoniae* serotipo 2 (cepa D39/NCTC 7466)

<220>
 <223> hialuronano liasa

<400> 84

5

10

ES 2 566 549 T3

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

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>

5 <223> hialuronano liasa

<400> 85

ES 2 566 549 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	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
						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
						135						140			
Lys	Ile	Ala	Lys	Gln	Ile	Thr	Asn	Pro	Glu	Ser	Cys	Tyr	Tyr	Gln	Asp
145					150					155					160
Ser	Lys	Ala	Ile	Ala	Ile	Val	Lys	Asp	Gly	Met	Ala	Phe	Met	Tyr	Glu
				165					170					175	
His	Ala	Tyr	Asn	Leu	Asp	Arg	Glu	Asn	His	Gln	Thr	Thr	Gly	Lys	Glu
			180					185					190		
Asn	Lys	Glu	Asn	Trp	Trp	Val	Tyr	Glu	Ile	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala	Ile
		195					200					205			
Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu	Met	Tyr	Pro	Tyr	Phe	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile
		210				215						220			
Leu	Lys	Tyr	Thr	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Arg
225					230					235					240
Phe	Arg	Val	Arg	Ala	Ala	Asn	Phe	Ser	Pro	Phe	Glu	Ala	Asn	Ser	Gly
				245					250					255	
Asn	Leu	Ile	Asp	Met	Gly	Arg	Val	Lys	Leu	Ile	Ser	Gly	Ile	Leu	Arg
			260					265					270		
Lys	Asp	Asp	Leu	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Lys	Val
		275					280					285			
Phe	Thr	Leu	Val	Asp	Glu	Gly	Asn	Gly	Phe	Tyr	Gln	Asp	Gly	Ser	Leu
		290				295					300				
Ile	Asp	His	Val	Val	Thr	Asn	Ala	Gln	Ser	Pro	Leu	Tyr	Lys	Lys	Gly
305					310					315					320
Ile	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Leu	Ser
				325					330					335	
Gln	Leu	Ile	Pro	Ile	Ile	Gln	Lys	Thr	Lys	Ser	Pro	Ile	Lys	Ala	Asp
			340					345					350		
Lys	Met	Ala	Thr	Ile	Tyr	His	Trp	Ile	Asn	His	Ser	Phe	Phe	Pro	Ile
		355					360					365			
Ile	Val	Arg	Gly	Glu	Met	Met	Asp	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser
		370				375					380				
Arg	Phe	Asn	Ala	Gln	Ser	His	Val	Ala	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala
385					390					395					400
Ile	Leu	Arg	Ile	Ala	Asp	Met	Ser	Glu	Glu	Pro	His	Arg	Leu	Ala	Leu
				405					410					415	
Lys	Thr	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu	Val	Thr	Gln	Gly	Asn	Ala	Phe	Tyr	Asn
			420					425					430		
Val	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Thr	Tyr	His	Asp	Ile	Lys	Leu	Met	Lys	Glu
		435					440					445			
Leu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Val	Gln	Lys	Leu	Asp	Ser	Tyr	Val
		450				455					460				
Ala	Ser	Phe	Asn	Ser	Met	Asp	Lys	Leu	Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Lys	His
465					470					475					480
Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Met	Phe	Ser	Asn	Arg	Thr	Gln	Asn	Tyr

ES 2 566 549 T3

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

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

ES 2 566 549 T3

	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									

<210> 87

<211> 868

5 <212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M4 (cepa MGAS10750)

<220>

<223> hialuronano liasa

10

<400> 87

ES 2 566 549 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

ES 2 566 549 T3

```

Asn His Asn Leu Ser His Gln Gly Phe Tyr Ser Phe Pro His Pro Val
785                               790                               795                               800

Lys Gln Asn Gln Gln Gln Lys Leu Ala His Gln Gly Ile Ala Ala Lys
                               805                               810                               815
Asn Asn Ala Leu Asn Ser His Lys Ile Pro His Lys Arg Gln Arg Arg
                               820                               825                               830
Leu Pro Arg Thr Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Leu Glu Phe Leu Gly Gly
                               835                               840                               845
Ala Leu Val Ala Ser Phe Asn His Ile Thr Lys Pro Phe Arg Lys Lys
                               850                               855                               860
Asp Leu Arg Ile
865

```

- 5 <210> 88
- <211> 828
- <212> PRT
- <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M6

- <220>
- <223> hialuronano liasa

- 10 <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

ES 2 566 549 T3

<210> 89
<211> 556
<212> PRT
<213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M12 (cepa MGAS2096)

5

<220>
<223> hialuronano liasa

10

<400> 89

ES 2 566 549 T3

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

ES 2 566 549 T3

```

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
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

5 <212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M12 (cepa MGAS2096)

<220>

<223> hialuronano liasa

10

<400> 90

ES 2 566 549 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
 5 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M12 (cepa MGAS9429)

<220>
 <223> hialuronano liasa

10 <400> 91

ES 2 566 549 T3

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

Thr Asn Pro Asp Met Val Thr Phe His Asn Lys Ala Glu Lys Asp Ala
 115 120 125
 Gln Asn Ile Ile Lys Ser Tyr Gln Gly Pro Asp His Glu Asn Arg Thr
 130 135 140
 Tyr Leu Trp Glu His Ala Lys Asp Tyr Ser Ala Ser Thr Asn Ile Thr
 145 150 155 160
 Lys Thr Tyr Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ala Lys Gln Ile Thr Asn Pro
 165 170 175
 Glu Ser Cys Tyr Tyr Gln Asp Ser Lys Ala Ile Ala Ile Val Lys Asp
 180 185 190
 Gly Met Ala Phe Met Tyr Glu His Ala Tyr Asn Leu Asn Arg Glu Asn
 195 200 205
 His Gln Thr Thr Gly Lys Glu Asn Lys Glu Asn Trp Trp Val Tyr Glu
 210 215 220
 Ile Gly Thr Pro Arg Ala Ile Asn Asn Thr Leu Ser Leu Met Tyr Pro
 225 230 235 240
 Tyr Phe Thr Gln Glu Glu Ile Leu Lys Tyr Thr Ala Pro Ile Glu Lys
 245 250 255
 Phe Val Pro Asp Pro Thr Arg Phe Arg Val Arg Ala Ala Asn Phe Ser
 260 265 270
 Pro Phe Glu Ala Ser Ser Gly Asn Leu Ile Asp Met Gly Arg Val Lys
 275 280 285
 Leu Ile Ser Gly Ile Leu Arg Lys Asp Asp Leu Glu Ile Ser Asp Thr
 290 295 300
 Ile Lys Ala Ile Glu Lys Val Phe Thr Leu Val Asp Glu Gly Asn Gly
 305 310 315 320
 Phe Tyr Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp His Val Val Thr Asn Ala Gln
 325 330 335
 Ser Pro Leu Tyr Lys Lys Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn
 340 345 350
 Val Leu Ile Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ile Pro Ile Ile Gln Lys Thr
 355 360 365
 Lys Ser Pro Ile Glu Ala Asp Lys Met Ala Thr Ile Tyr His Trp Ile
 370 375 380
 Asn His Ser Phe Phe Pro Ile Ile Val Arg Gly Glu Met Met Asp Met
 385 390 395 400
 Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser Arg Phe Asn Ala Gln Ser His Val Ala
 405 410 415
 Gly Ile Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu Arg Ile Ala Asp Met Ser Glu
 420 425 430
 Glu Pro His Arg Leu Ala Leu Lys Thr Arg Ile Lys Thr Leu Val Thr
 435 440 445
 Gln Gly Asn Ala Phe Tyr Asn Val Tyr Asp Asn Leu Lys Thr Tyr His
 450 455 460
 Asp Ile Lys Leu Met Lys Glu Leu Leu Ser Asp Thr Ser Val Pro Val
 465 470 475 480
 Gln Lys Leu Asp Ser Tyr Val Ala Ser Phe Asn Ser Met Asp Lys Leu
 485 490 495
 Ala Leu Tyr Asn Asn Lys His Asp Phe Ala Phe Gly Leu Ser Met Phe
 500 505 510
 Ser Asn Arg Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Met Asn Asn Glu Asn Leu His
 515 520 525
 Gly Trp Phe Thr Ser Asp Gly Met Phe Tyr Leu Tyr Asn Asn Asp Leu
 530 535 540
 Gly His Tyr Ser Glu Asn Tyr Trp Ala Thr Val Asn Pro Tyr Arg Leu
 545 550 555 560
 Pro Gly Thr Thr Glu Thr Glu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Thr Pro Glu
 565 570 575
 Asn Ile Lys Thr Asn Tyr Gln Gln Val Gly Met Thr Ser Leu Ser Asp
 580 585 590
 Asp Ala Phe Val Ala Ser Lys Lys Leu Asn Asn Thr Ser Ala Leu Ala
 595 600 605
 Ala Met Thr Phe Thr Asn Trp Asn Lys Ser Leu Thr Leu Asn Lys Gly
 610 615 620
 Trp Phe Ile Leu Gly Asn Lys Ile Ile Phe Val Gly Ser Asn Ile Lys

625					630					635				640	
Asn	Gln	Ser	Ser	His	Lys	Ala	Tyr	Thr	Thr	Ile	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu
				645					650					Lys	Glu
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> 92
 <211> 828
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogenes* serotipo M28

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<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 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

ES 2 566 549 T3

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*

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<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	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*

5

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<400> 94

ES 2 566 549 T3

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

Ser Leu Val Glu Tyr Val Glu Lys Thr Pro Glu Thr Pro Glu Gln Ser
 260 265 270
 Pro Glu Leu Val Gln Pro Glu Thr Gly Gln Ile Ser Leu Ala Ser Asn
 275 280 285
 Lys Val Tyr Leu Pro Val Arg Pro Asp Leu Thr Tyr Arg Ile Ala Asp
 290 295 300
 Ala Ala Val Ala Thr Val Glu Lys Asn Met Ile Arg Pro Leu Ala Ala
 305 310 315 320
 Gly Lys Thr Gln Val Asp Val Tyr Asp Lys Asp Thr Lys Leu Ser Ser
 325 330 335
 Phe Glu Leu Ile Val Thr Glu His Gln Ala Thr Val Phe Asp Thr Leu
 340 345 350
 Arg Asn Asn Trp Glu Asp Ile Ser Leu Ala Asn Lys Arg Tyr Gln Ser
 355 360 365
 Asn Asp Ala Gln Met Lys Ala Phe Leu Gly Arg Leu Asp Ala Gly Val
 370 375 380
 Ala Ser Ser Leu Glu Lys Trp Val Glu Pro Thr Glu Gln Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Ile Phe Asn Asp Ile Asp Phe Ser Lys Ser Ser His Leu Thr Thr Val
 405 410 415
 Tyr Arg Arg Leu Glu Gln Met Ala Gln Val Val Glu Asn Pro Asp Ser
 420 425 430
 Ala Tyr Tyr His Asp Arg Ser Leu Ile Asp Leu Val Arg Lys Gly Met
 435 440 445
 Asn Trp Leu Tyr Ala Asn Val Tyr Asn Glu Asn Lys Ser Ile Asp Gly
 450 455 460
 Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Ser Arg Ala Val Val Asn Thr
 465 470 475 480
 Leu Ile Tyr Met His Pro Tyr Phe Ser Gln Glu Glu Ile Leu Thr Tyr
 485 490 495
 Thr Lys Pro Ile Ser Lys Phe Val Pro Asp Pro Thr Thr Ile Arg Lys
 500 505 510
 Thr Leu Thr Asn Pro Val Pro Ala Val Gly Gly Asn Gln Thr Asp Leu
 515 520 525
 Ser Lys Val Ala Ile Leu Glu Gly Ala Leu Arg Glu Asp Ala Asp Arg
 530 535 540
 Val Arg Ala Gly Ala Gln Gly Leu Thr Thr Ile Met Lys Phe Val Asp
 545 550 555 560
 Lys Gly Glu Gly Phe Tyr Arg Asp Gly Ser Phe Ile Asp His Thr Asn
 565 570 575
 Val Ala Tyr Thr Gly Ala Tyr Gly Asn Val Leu Ile Glu Gly Phe Ser
 580 585 590
 Gln Leu Leu Pro Val Ile Gln Pro Thr Glu Phe Ala Leu Lys Glu Glu
 595 600 605
 Gln Thr Asn Ile Leu Tyr Glu Trp Ile Glu Lys Ala Phe Met Pro Ile
 610 615 620
 Leu Val Arg Gly Glu Leu Met Asp Met Thr Arg Gly Arg Ser Ile Ser
 625 630 635 640
 Arg Ala Thr Gly Glu Ser His Val Gln Ala Met Glu Ile Leu Arg Ser
 645 650 655
 Leu Val Arg Ile Ala Glu Ser Ala Gln Pro Glu Gln Lys Thr Lys Leu
 660 665 670
 Leu Ser Phe Val Lys Ala Gln Leu Thr Ser Asp Thr Phe Tyr Asp Ser
 675 680 685
 Tyr Arg Ser Leu Lys Ser Tyr Lys Asp Ile Asp Leu Val Asn Lys Leu
 690 695 700
 Leu Ala Asp Asn Gln Ile Pro Ala Glu Val Asp Lys Asp Tyr Ile Ala
 705 710 715 720
 Ala Phe Asn Asn Met Asp Lys Phe Val Tyr Arg Ser Ala Gln Glu Gly
 725 730 735
 Phe Thr Phe Ala Leu Ser Met Tyr Ser Ser Arg Thr Gln Asn Tyr Glu
 740 745 750
 Asp Met Asn Asn Glu Asn Arg Lys Gly Trp Tyr Thr Ala Asp Gly Met
 755 760 765
 Val Tyr Leu Tyr Asn Asp Asp Leu Ser His Tyr Ser Asn His Tyr Trp

	770		775		780														
Ala	Thr	Val	Asp	Pro	Tyr	Arg	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Asp				
785					790					795					800				
Lys	Arg	Glu	Asp	Gly	Ser	Gly	Glu	Val	Thr	Leu	Ala	Ser	Asp	Phe	Val				
				805					810					815					
Gly	Ala	Ser	Gln	Leu	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Thr	Ile	Ala	Met	Asp	Phe				
			820					825					830						
Asn	Asn	Trp	Asn	Asn	Ser	Leu	Thr	Ala	Arg	Lys	Ala	Trp	Ile	Val	Leu				
		835					840					845							
Gly	Asn	Lys	Ile	Val	Phe	Leu	Gly	Thr	Asp	Ile	Gln	His	Gln	Ser	Ala				
	850					855					860								
Gln	Gly	Ala	Glu	Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Leu	Leu	Thr	Gly	Glu				
865					870					875					880				
Lys	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Asn	Gly	Gln	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Glu				
			885						890					895					
Val	Val	Thr	Asp	Lys	Thr	Gln	Ser	Phe	Tyr	Met	Thr	Asn	Gly	Lys	Asp				
			900					905					910						
Asn	Gln	Ser	Ile	Gly	Tyr	Val	Phe	Leu	Asn	Gln	Leu	Pro	Thr	His	Ala				
		915					920					925							
Lys	Leu	Asp	Gln	Arg	Thr	Gly	Lys	Trp	Ser	Asp	Ile	Asn	Tyr	Asn	Gln				
	930					935					940								
Ser	Lys	Glu	Glu	Val	Ser	Asn	Ser	Phe	Val	Ser	Leu	Trp	His	Glu	His				
945					950					955					960				
Ala	Gln	Thr	Ser	Ser	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Val	Leu	Val	Pro	Asn	Gln	Ser				
				965						970				975					
Met	Glu	Lys	Val	Asn	Gln	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Leu	His	Gln				
			980					985					990						
Asp	Arg	Asp	Leu	Gln	Val	Val	Tyr	Asp	Gln	Glu	Gln	Asn	Val	Trp	Gly				
		995					1000					1005							
Val	Val	Lys	Tyr	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr	Lys	Leu	Thr	Asp	Asp	Ile	Thr				
	1010					1015						1020							
Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Thr	Ile	Gln	Lys	Val	Glu	Gly	Gly	Tyr				
1025					1030						1035				1040				
Arg	Ile	Ala	Phe	Tyr	Asn	Pro	Ser	Thr	Arg	Thr	Val	Lys	Asn	Gly	Ile				
			1045						1050					1055					
Glu	Leu	Thr	Lys	Ala	Gly	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Glu	Met	Glu	Pro	Thr				
			1060						1065				1070						
Ala	Ala	Tyr	Pro	Ser	Thr	Val	Trp	Lys	Val	Thr	Met	Pro	Glu	Gly	Ser				
		1075					1080					1085							
Asp	Lys	Gln	Thr	Gly	Ser	Val	Glu	Lys	Thr	Glu	Lys	Glu	Glu	Lys	Gln				
	1090					1095					1100								
Leu	Lys	Glu	Asn	Gln	Pro	Ser	Ser	Glu	Val	Lys	Gln	Val	Val	His	His				
1105					1110						1115				1120				
Ala	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	Thr	Gly				
				1125						1130				1135					
Glu	Glu	Ala	Ser	Leu	Gly	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Thr	Leu	Gly				
			1140					1145					1150						
Ala	Val	Val	Asp	Phe	Lys	Cys	Arg	Arg	Ser	His	Ser								
			1155					1160											

<210> 95
 <211> 1164
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus suis*

<220>
 <223> hialuronano liasa

<400> 95

ES 2 566 549 T3

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

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 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

ES 2 566 549 T3

	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> 96
 <211> 802
 5 <212> PRT
 <213> *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601 / ES114)

<220>
 <223> hialuronano liasa

10

<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)

5 <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

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

Val Thr Thr His His Trp Gly Tyr Ser Ser Arg Trp Trp Tyr Ile Ser
 385 390 400
 Thr Leu Leu Met Ser Asp Ala Leu Lys Glu Ala Asn Leu Gln Thr Gln
 405 415
 Val Tyr Asp Ser Leu Leu Trp Tyr Ser Arg Glu Phe Lys Ser Ser Phe
 420 425 430
 Asp Met Lys Val Ser Ala Asp Ser Ser Asp Leu Asp Tyr Phe Asn Thr
 435 440 445
 Leu Ser Arg Gln His Leu Ala Leu Leu Leu Leu Glu Pro Asp Asp Gln
 450 455 460
 Lys Arg Ile Asn Leu Val Asn Thr Phe Ser His Tyr Ile Thr Gly Ala
 465 470 475 480
 Leu Thr Gln Val Pro Pro Gly Gly Lys Asp Gly Leu Arg Pro Asp Gly
 485 490 495
 Thr Ala Trp Arg His Glu Gly Asn Tyr Pro Gly Tyr Ser Phe Pro Ala
 500 505 510
 Phe Lys Asn Ala Ser Gln Leu Ile Tyr Leu Leu Arg Asp Thr Pro Phe
 515 520 525
 Ser Val Gly Glu Ser Gly Trp Asn Asn Leu Lys Lys Ala Met Val Ser
 530 535 540
 Ala Trp Ile Tyr Ser Asn Pro Glu Val Gly Leu Pro Leu Ala Gly Arg
 545 550 555 560
 His Pro Phe Asn Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr
 565 570 575
 Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser
 580 585 590
 Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile
 595 600 605
 Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala
 610 615 620
 Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val
 625 630 635 640
 Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn
 645 650 655
 Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile
 660 665 670
 Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp
 675 680 685
 Asp Trp Asn Arg Met Glu Gly Ala Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys
 690 695 700
 Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg
 705 710 715 720
 Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala
 725 730 735
 Phe Asn Leu Ile Tyr Pro Ala Asn Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe
 740 745 750
 Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile
 755 760 765
 Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr
 770 775 780
 Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn
 785 790 795 800
 Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly
 805 810 815
 Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala
 820 825 830
 Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln His Gln Val Ser Ala Glu Asn Lys
 835 840 845
 Asn Arg Gln Pro Thr Glu Gly Asn Phe Ser Ser Ala Trp Ile Asp His
 850 855 860
 Ser Thr Arg Pro Lys Asp Ala Ser Tyr Glu Tyr Met Val Phe Leu Asp
 865 870 875 880
 Ala Thr Pro Glu Lys Met Gly Glu Met Ala Gln Lys Phe Arg Glu Asn
 885 890 895
 Asn Gly Leu Tyr Gln Val Leu Arg Lys Asp Lys Asp Val His Ile Ile

ES 2 566 549 T3

				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> 700
 <212> PRT
 <213> *Pedobacter heparinus*

5

<220>
 <223> condroitin AC liasa

10

<400> 99

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

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

<210> 100
 <211> 844
 5 <212> PRT
 <213> *Victivallis vadensis* ATCC BAA-548

<220>
 <223> condroitin AC liasa

10 <400> 100

ES 2 566 549 T3

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

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> 110
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- <220>
- 10 <223> Preproinsulina

- <220>
- <221> SIGNAL
- <222> (1)...(24)
- 15 <223> Secuencia de señal

- <220>
- <221> CHAIN
- <222> (25)...(54)
- 20 <223> Cadena B de insulina

- <220>
- <221> PROPEP
- <222> (57)...(87)
- 25 <223> Péptido C de insulina

- <220>
- <221> CHAIN
- <222> (90)...(110)

<223> Cadena A de insulina

<400> 101

```

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

5

<210> 102

<211> 86

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<220>

<223> Proinsulina

<220>

<221> CHAIN

<222> (66)...(86)

<223> Cadena B de insulina

15

<220>

<221> PROPEP

<222> (33)...(63)

<223> Péptido C de insulina

20

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)...(30)

<223> Cadena A de insulina

25

<400> 102

30

```

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

<210> 103

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<220>

<223> Cadena A de insulina

40

<400> 103

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu

1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

5 <210> 104
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Cadena B de insulina

<400> 104

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

15 <210> 105
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Gorilla gorilla*

20 <220>
 <223> Preproinsulina

25 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (66)...(86)
 <223> Cadena B de insulina

30 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (1)...(30)
 <223> Cadena A de insulina

35 <400> 105

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

40 <210> 106
 <211> 110
 <212> PRT

<213> *Pongo pygmaeus*

<220>

<223> Preproinsulina

5

<400> 106

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu

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

10

<210> 107

<211> 110

<212> PRT

<213> *Pan troglodytes*

15

<220>

<223> Preproinsulina

<400> 107

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

20

<210> 108

<211> 110

<212> PRT

25

<213> *Macaca fascicularis*

<220>

<223> Preproinsulina

30

<400> 108

ES 2 566 549 T3

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

- <210> 109
- <211> 110
- 5 <212> PRT
- <213> *Cercopithecus aethiops*
- <220>
- <223> Preproinsulina
- 10 <400> 109

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

- 15 <210> 110
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> *Canis familiaris*
- 20 <220>
- <223> Preproinsulina
- <400> 110

```

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

```

5 <210> 111
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Spermophilus tridecemlineatus*

10 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 111

```

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

```

15 <210> 112
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Volemys kikuchii*

20 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 112

25

ES 2 566 549 T3

```

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

```

- 5 <210> 113
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> *Aotus trivirgatus*
- <220>
- <223> Preproinsulina
- 10 <400> 113

```

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

```

- 15 <210> 114
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> *Apodemus semotus*
- 20 <220>
- <223> Preproinsulina 1
- <400> 114

ES 2 566 549 T3

```

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

```

5 <210> 115
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Apodemus semotus*

10 <220>
 <223> Preproinsulina 2
 <400> 115

```

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

```

15 <210> 116
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Cricetulus longicaudatus*

20 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 116

ES 2 566 549 T3

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

<210> 117
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<220>
 <223> Preproinsulina 1

10

<400> 117

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

<210> 118
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

15

<220>
 <223> Preproinsulina 2

20

<400> 118

ES 2 566 549 T3

```

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

```

5 <210> 119
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Rattus losea*

10 <220>
 <223> Preproinsulina 1
 <400> 119

```

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

```

15 <210> 120
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Rattus losea*

20 <220>
 <223> Preproinsulina 2
 <400> 120

ES 2 566 549 T3

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

<210> 121
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Niviventer coxingi*

5

<220>
 <223> Preproinsulina 1

10

<400> 121

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

<210> 122
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Niviventer coxingi*

15

<220>
 <223> Preproinsulina 2

20

<400> 122

```

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

```

5 <210> 123
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

10 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 123

```

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

```

15 <210> 124
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Meriones unguiculatus*

20 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 124

```

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

```

25

ES 2 566 549 T3

```

          35          40          45
Phe Tyr Thr Pro Lys Phe Arg Arg Gly Val Glu Asp Pro Gln Met Pro
  50          55          60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Ala Leu
  65          70          75          80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
          85          90          95
Thr Gly Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
          100          105          110

```

5 <210> 125
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 125

```

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

```

15 <210> 126
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <220>
 <223> Preproinsulina 1
 <400> 126

```

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

```

25 <210> 127
 <211> 110

ES 2 566 549 T3

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <220>
 <223> Preproinsulina 2

<400> 127

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

10 <210> 128
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Mus spretus*

15 <220>
 <223> Preproinsulina 2

<400> 128

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

25 <210> 129
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus caroli*

<220>
 <223> Preproinsulina 1

<400> 129

ES 2 566 549 T3

```

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

65          70          75          80
Glu Val Ala Arg Glu Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys Thr Ser
      85          90          95
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      100          105

```

5 <210> 130
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Mus caroli*

10 <220>
 <223> Preproinsulina 2
 <400> 130

```

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

```

15 <210> 131
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Psammomys obesus*

20 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 131

ES 2 566 549 T3

```

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

```

5 <210> 132
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Felis silvestris catus*

10 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 132

```

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

```

15 <210> 133
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

20 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 133

ES 2 566 549 T3

```

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

```

5 <210> 134
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*

10 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 134

```

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

```

15 <210> 135
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> *Cavia porcellus*

20 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 135

ES 2 566 549 T3

```

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

```

5 <210> 136
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> *Equus caballus*

10 <220>
 <223> Proinsulina

15 <220>
 <221> UNSURE
 <222> 31
 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

20 <220>
 <221> UNSURE
 <222> 32
 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

25 <220>
 <221> UNSURE
 <222> 64
 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

30 <220>
 <221> UNSURE
 <222> 65
 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

<400> 136

```

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

 65           70           75           80
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
           85

```

35 <210> 137
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Octodon degus*

<220>
 <223> Preproinsulina

5 <400> 137

```

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

10 <210> 138
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> *Chinchilla brevicaudata*

15 <220>
 <223> Proinsulina

<220>
 <221> UNSURE
 <222> 31
 20 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

<220>
 <221> UNSURE
 <222> 32
 25 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

<220>
 <221> UNSURE
 <222> 64
 30 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

<220>
 <221> UNSURE
 <222> 65
 35 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

<400> 138

ES 2 566 549 T3

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

 Glu Ala Gly Arg Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Met Thr Leu Gln Xaa
 50 55 60
 Xaa Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Thr Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

5 <210> 139
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*

10 <220>
 <223> Preproinsulina
 <400> 139

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

15 <210> 140
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Selasphorus rufus*

20 <220>
 <223> Proinsulina
 <400> 140

ES 2 566 549 T3

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

<210> 141
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

5

<220>
 <223> Preproinsulina 1

10

<400> 141

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

<210> 142
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

15

<220>
 <223> Preproinsulina 2

20

<400> 142

ES 2 566 549 T3

```

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

```

- <210> 143
- <211> 106
- 5 <212> PRT
- <213> *Xenopus tropicalis*
- <220>
- <223> Preproinsulina
- 10 <400> 143

```

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

```

- 15 <210> 144
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> *Rana pipiens*
- 20 <220>
- <223> Preproinsulina
- <400> 144

ES 2 566 549 T3

```

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

```

5 <210> 145
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> *Anas platyrhynchos*

10 <220>
 <223> Preproinsulina

<220>
 <221> UNSURE
 <222> 31
 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

15 <220>
 <221> UNSURE
 <222> 32
 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

20 <220>
 <221> UNSURE
 <222> 59
 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

25 <220>
 <221> UNSURE
 <222> 60
 <223> Xaa = Resto básico supuesto mediante homología

30 <400> 145

```

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

           50           55           60
Gln Cys Cys Glu Asn Pro Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
65           70           75           80
Asn

```

35 <210> 146
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> *Capra hircus*

ES 2 566 549 T3

<220>
<223> Preproinsulina

5 <400> 146

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1          5          10
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Gly Ile
          20          25          30
Val Glu Gln Cys Cys Ala Gly Val Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn
          35          40          45
Tyr Cys Asn
          50
    
```

10 <210> 147
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <220>
<223> Insulina Aspart

<220>
<223> Cadena B de análogo de insulina

20 <400> 147

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1          5          10
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr
          20          25          30
    
```

25 <210> 148
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<223> Insulina Lispro

<220>
<223> Cadena B de análogo de insulina

35 <400> 148

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1          5          10
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr
          20          25          30
    
```

40 <210> 149
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <220>
<223> Insulina Glulisina

<220>
<223> Cadena B de análogo de insulina

50 <400> 149

ES 2 566 549 T3

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

5 <210> 150
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Insulina Glargina

<220>
 <223> Cadena A de análogo de insulina

15 <400> 150

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Gly
 20

20 <210> 151
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <223> Insulina Glargina

<220>
 <223> Cadena B de análogo de insulina

30 <400> 151

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

35 <210> 152
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <223> Insulina Detemir

<220>
 <223> Análogo de proinsulina

45 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (33)...(53)
 <223> Cadena A

50 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (1) ... (29)
 <223> Cadena B

ES 2 566 549 T3

<400> 152

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1           5           10           15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Ala Lys
           20           25           30
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
           35           40           45
Glu Asn Tyr Cys Asn
 50
    
```

5

<210> 153
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>
 <223> Cadena B de análogo de insulina

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 28
 <223> Xaa=Pro, Lys, Leu, Val o Ala

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 29
 <223> Xaa=Lys o Pro

25

<400> 153

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1           5           10           15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Xaa Xaa Thr
           20           25           30
    
```

30

<210> 154
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35

<220>
 <223> Cadena B de análogo de insulina (des 28-30)

<400> 154

```

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1           5           10           15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
           20           25
    
```

40

<210> 155
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45

<220>
 <223> Cadena B de análogo de insulina (des 27)

<400> 155

ES 2 566 549 T3

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

5 <210> 156
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Cadena A de análogo de insulina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 21
 <223> Xaa=Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Thr o Ser

15 <400> 156

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Xaa
20

20 <210> 157
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <223> Cadena B de análogo de insulina

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa=Phe, Asp o ninguno

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> Xaa=Val o ninguno

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa=Asn o Asp

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa=Ser o Asp

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 10
 <223> Xaa=His o Asp

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 28
 <223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE
 <222> 29
 <223> Xaa=L-Pro, D-Pro, D-hidroxipro, 1,-hidroxipro, 1,-(N-metilisina),
 D-Lisina, L-(N-metil arginina) o D-arginina
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 30
 <223> Xaa=Ala o Thr
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 31
 <223> Xaa=Arg, Arg-Arg, Lys, Lys-Lys, Arg-Lys, Lys-Arg o ninguno
 15
 <400> 157

Xaa	Xaa	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Xaa	Xaa	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
			20					25					30		

 <210> 158
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <220>
 <223> Cadena A de análogo de insulina

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa=His, Phe, Gly, Gln, Glu, Ser, Asn, Asp, o Pro
 30

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa=Gly, Asp, Glu, Thr, His, Gln, Asn, Ala o Pro
 35

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 10
 <223> Xaa=Leu, Pro, Val, His, Ala, Glu, Asp, Thr, Gln o Asn
 40

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13
 <223> Xaa=Pro, Val, Arg, His, Ala, Glu, Asp, Thr, Gly, Gln o Asn
 45

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 21
 <223> Xaa=Asp o Glu
 50

 <400> 158

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Ser	Xaa	Tyr	Gln	Leu
1				5				10						15	
Glu	Asn	Tyr	Cys	Xaa											
			20												

 <210> 159
 <211> 30
 <212> PRT
 55

<213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Cadena B de análogo de insulina

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa=Phe, Glu, Asp, Thr o Ser

10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> Xaa=Val, Arg, His, Ala, Glu, Asp, Thr, Pro, Gly, Gln, Ser o Asn

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa=His, Ala, Glu, Asp, Thr, Ser, Gln, o Asn

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa=Ser, Leu, Asp, Pro, Glu, Ile, Val, His, Thr, Gln, Asn, Met, Tyr, Trp o Phe

25

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 10
 <223> Xaa=His, Asn, Leu, Asp, Arg, Glu, Ser, Thr, Ile o Gln

30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12
 <223> Xaa=Val, Asn, His, Ile o Tyr

35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 14
 <223> Xaa=Ala, Glu, Asp, Asn, Gln, Ser, Thr, Gly

40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 16
 <223> Xaa=Tyr, Asp, Glu, Gln, Asn, Ser, Thr, His o Arg

45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> Xaa=Leu, Ser, Thr, Asn, Gln, Glu, Asp o His

50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa=Val, Ser, Thr, Asn, Gln o His

55

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 20
 <223> Xaa=Gly, Gln, Ser, Thr, Asn, Asp, Glu, His o Arg

60

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 26
 <223> Xaa=Tyr, Ala, Asp, His o Glu

65

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 27
 <223> Xaa=Thr, Asp, His o Glu
 5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 28
 <223> Xaa=Pro, Asp o Glu
 10

<400> 159

Xaa	Xaa	Asn	Gln	Xaa	Leu	Cys	Gly	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Glu	Xaa	Leu	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Lys	Thr		
		20					25						30		

<210> 160
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15

<220>
 <223> Cadena A de análogo de insulina
 20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 21
 <223> Xaa=Asn, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr,
 Cys, Tyr, Asp o Glu
 25

<400> 160
 30

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu
1				5					10					15	
Glu	Asn	Tyr	Cys	Xaa											
			20												

<210> 161
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35

<220>
 <223> Cadena B de análogo de insulina
 40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa=Phe o ninguno
 45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 29
 <223> Xaa=Ly, Ala, Thr o Ser
 50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 30
 <223> Xaa=Thr, Arg, Lys, Hyl, Orn o Cit
 55

<400> 161

ES 2 566 549 T3

Xaa Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Xaa Xaa
20 25 30

5 <210> 162
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Cadena A de análogo de insulina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 21
 <223> Xaa=Asn, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp, Glu, His o Gln
 15 <400> 162

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Xaa
20

20 <210> 163
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <223> Cadena B de análogo de insulina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa=Phe o ninguno
 30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa=Asn, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp, Glu, His o Gln
 35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 30
 <223> Xaa=Asn, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp, Glu, His o Gln
 40

45 <400> 163

Xaa Val Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Xaa
20 25 30

50 <210> 164
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Cadena A de análogo de insulina
 55

ES 2 566 549 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido enlazador

5 <400> 167

Ser Ser Pro Pro Pro Pro Cys
1 5

10 <210> 168
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia de péptido enlazador

<400> 168

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

20 <210> 169
<211> 5
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido enlazador

30 <220>
<221> REPETICIÓN
<222> (1)...(5)
<223> Péptido enlazador de repetición

35 <400> 169

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

40 <210> 170
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia de péptido enlazador

<400> 170

Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
1 5 10

50 <210> 171
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Secuencia de péptido enlazador

<400> 171

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

5 <210> 172
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de péptido enlazador
 <400> 172

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly

15 <210> 173
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de péptido enlazador
 <400> 173

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

25 <210> 174
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de péptido enlazador
 <400> 174

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly

35 <210> 175
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de péptido enlazador
 <400> 175

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe
1 5 10

45 <210> 176
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 566 549 T3

<220>
<223> Secuencia de péptido enlazador

5 <400> 176

Ser Arg Ser Ser Gly
1 5

10 <210> 177
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia de péptido enlazador

<400> 177

Ser Gly Ser Ser Cys
1 5

20 <210> 178
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia de péptido enlazador

<400> 178

30 <210> 179
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

Ala Ala Lys
1

35 <220>
<223> Secuencia de péptido enlazador

<400> 179

Val Met
1

45 <210> 180
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Secuencia de péptido enlazador

<400> 180

Ala Met
1

55 <210> 181

ES 2 566 549 T3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de péptido enlazador

10

<220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (3)...(5)
 <223> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 repeticiones

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa=Gly, Gly-Gly o Gly-Gly-Gly

<400> 181

Ala Met Gly Xaa Ser Ala Met
 1 5

20

<210> 182
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<220>
 <223> HMR-1 153 cadena B

30

<400> 182

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

35

<210> 183
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

<220>
 <223> HMR-1 1423 cadena A

<400> 183

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Gly
 20

45

<210> 184
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50

<220>
 <223> HMR-1 1423 cadena A

<400> 184

ES 2 566 549 T3

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

- <210> 185
- <211> 510
- 5 <212> PRT
- <213> *Pan troglodytes*

- <220>
- 10 <223> PH20 de chimpancé

- <400> 185

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 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

ES 2 566 549 T3

465					470					475				480	
Phe	Tyr	Asn	Ala	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Thr	Met	Phe	Ile	Asp
				485					490					495	
Leu	Cys	Asp	Leu	Tyr	Leu	Val	Pro	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ile	Leu		
			500					505					510		

<210> 186

<211> 512

5 <212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<220>

10 <223> PH20 de mono Rhesus

<400> 186

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

ES 2 566 549 T3

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> 187
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-505 de precursor de HuPH20

10

<400> 187

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> 188
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-503 de precursor de HuPH20

10

<400> 188

ES 2 566 549 T3

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

225					230					235				240	
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser
				245					250					255	
Thr	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val
			260					265					270		
Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val
		275					280				285				
Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr
	290					295					300				
Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu
305					310					315					320
Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile
				325					330					335	
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu
			340					345					350		
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn
		355				360						365			
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln
	370					375					380				
Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu
385					390					395					400
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr
				405					410					415	
Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys
			420					425					430		
Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp
		435					440					445			
Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys
	450					455					460				
Ile	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro	Gln	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> 189
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-501 de precursor de HuPH20

10

<400> 189

ES 2 566 549 T3

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

145					150					155					160
Lys	Asp	Val	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn
				165					170						175
Val	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe
			180						185						190
Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys
		195					200					205			
Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys
		210				215					220				
Tyr	Asn	His	His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn
225					230					235					240
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser
			245						250						255
Thr	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val
			260					265							270
Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val
		275					280					285			
Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr
	290				295						300				
Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu
305					310					315					320
Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile
			325						330						335
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu
			340					345							350
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn
		355				360						365			
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln
	370					375						380			
Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu
385					390					395					400
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr
			405						410						415
Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys
			420					425							430
Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp
		435				440						445			
Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys
	450					455					460				
Ile	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro	Gln	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> 190
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-499 de precursor de HuPH20

10

<400> 190

ES 2 566 549 T3

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

65					70					75				80	
Ile	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Val	Thr	Ile	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg	Leu
				85					90					95	
Gly	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Asn	Gly
			100					105					110		
Gly	Ile	Pro	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys
		115					120					125			
Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val
		130				135					140				
Ile	Asp	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro
145					150					155					160
Lys	Asp	Val	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn
				165					170					175	
Val	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe
			180					185					190		
Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys
		195					200					205			
Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys
		210				215					220				
Tyr	Asn	His	His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn
225					230					235					240
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser
				245					250					255	
Thr	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val
			260					265					270		
Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val
		275					280					285			
Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr
		290				295					300				
Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu
305					310					315					320
Leu	Val	Tyr	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile
				325					330					335	
Val	Ile	Trp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu
			340					345					350		
Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn
		355						360				365			
Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln
		370					375				380				
Gly	Val	Cys	Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu
385					390					395					400
Asn	Pro	Asp	Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr
				405					410					415	
Val	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys
				420				425					430		
Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp
		435					440					445			
Val	Lys	Asp	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys
		450				455					460				
Ile	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro	Gln	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> 191
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>

<223> 1-497 de precursor de HuPH20

<400> 191

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> 192
<211> 495
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<220>
<223> 1-495 de precursor de HuPH20

10

<400> 192

ES 2 566 549 T3

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

ES 2 566 549 T3

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> 193

<211> 493

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> 1-493 de precursor de HuPH20

<400> 193

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

ES 2 566 549 T3

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

<210> 194
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-491 de precursor de HuPH20

10

<400> 194

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> 195
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-489 de precursor de HuPH20

10

<400> 195

ES 2 566 549 T3

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

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

<210> 196
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-490 de precursor de HuPH20

10

<400> 196

ES 2 566 549 T3

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

ES 2 566 549 T3

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

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

<210> 198
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-485 de precursor de HuPH20

10

<400> 198

ES 2 566 549 T3

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

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

<210> 199
 <211> 484
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>

5

<223> 1-484 de precursor de HuPH20

<400> 199

ES 2 566 549 T3

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

5

<220>
<223> 1-476 de precursor de HuPH20

10

<400> 200

ES 2 566 549 T3

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

ES 2 566 549 T3

	<210> 201
	<211> 475
	<212> PRT
5	<213> <i>Homo sapiens</i>
	<220>
	<223> 1-475 de precursor de HuPH20
10	<400> 201

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					

ES 2 566 549 T3

<210> 202
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-474 de precursor de HuPH20

10

<400> 202

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1      5      10
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
  
```

ES 2 566 549 T3

		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> 203
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-473 de precursor de HuPH20

10

<400> 203

ES 2 566 549 T3

<210> 204
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-472 de precursor de HuPH20

10

<400> 204

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1      5      10
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
    
```


ES 2 566 549 T3

<210> 206
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-470 de precursor de HuPH20

10

<400> 206

```

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1          5          10          15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20          25          30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro 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> 207
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-469 de precursor de HuPH20

10

<400> 207

ES 2 566 549 T3

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

```

      115              120              125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
  130              135              140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145              150              155
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
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
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
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> 208
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-468 de precursor de HuPH20

10

<400> 208

ES 2 566 549 T3

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

ES 2 566 549 T3

<210> 209

<211> 466

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 1-466 de precursor de HuPH20

10 <400> 209

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys

ES 2 566 549 T3

```

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

```

<210> 210
 <211> 465
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 1-465 de precursor de HuPH20

5

<400> 210

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

ES 2 566 549 T3

- <210> 211
- <211> 464
- <212> PRT
- 5 <213> *Homo sapiens*

- <220>
- <223> 1-464 de precursor de HuPH20

- 10 <400> 211

ES 2 566 549 T3

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

<211> 462
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> 1-462 de precursor de HuPH20

<400> 212

```

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

ES 2 566 549 T3

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				

<210> 213
<211> 460
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<220>
<223> 1-460 de precursor de HuPH20

10

<400> 213

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

<210> 214
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-458 de precursor de HuPH20

10

<400> 214

```

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

ES 2 566 549 T3

```

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

```

<210> 215
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-456 de precursor de HuPH20

10

<400> 215

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

ES 2 566 549 T3

<210> 216
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-454 de precursor de HuPH20

10

<400> 216

```

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

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

<210> 217
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-452 de precursor de HuPH20

10

<400> 217

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 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
 100 110
 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

<211> 450
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> 1-450 de precursor de HuPH20

<400> 218

```

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
    
```

10

ES 2 566 549 T3

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> 219
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-508 de precursor de HuPH20

10

<400> 219

ES 2 566 549 T3

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

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

<210> 220
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-506 de precursor de HuPH20

10

<400> 220

ES 2 566 549 T3

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

Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln 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> 221
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-504 de precursor de HuPH20

10

<400> 221

ES 2 566 549 T3

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

Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln 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> 222
<211> 502
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<220>
<223> 1-502 de precursor de HuPH20

10

<400> 222

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

ES 2 566 549 T3

```
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> 223
- <211> 500
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- <220>
- 10 <223> 1-500 de precursor de HuPH20

- <400> 223

ES 2 566 549 T3

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

ES 2 566 549 T3

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> 224
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-498 de precursor de HuPH20

10

<400> 224

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

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

<210> 225
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-496 de precursor de HuPH20

10

<400> 225

ES 2 566 549 T3

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

ES 2 566 549 T3

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> 226
 <211> 494
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-494 de precursor de HuPH20

10

<400> 226

ES 2 566 549 T3

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

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

<210> 227
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-492 de precursor de HuPH20

10

<400> 227

ES 2 566 549 T3

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

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

<210> 228
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 1-488 de precursor de HuPH20

10

<400> 228

ES 2 566 549 T3

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

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

<210> 229
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 1-486 de precursor de HuPH20

<400> 229

5

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

<210> 230
<211> 472
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<220>
<223> 36-507 de HuPH20 madura

10

<400> 230

ES 2 566 549 T3

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 35 40 45
 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
 85 90 95
 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
 100 105 110
 Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
 115 120 125
 Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
 130 135 140
 Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
 145 150 155 160
 Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
 165 170 175
 Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
 180 185 190
 His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
 195 200 205
 Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
 210 215 220
 Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
 225 230 235 240
 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
 245 250 255
 Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
 260 265 270
 Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
 275 280 285
 Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
 290 295 300
 Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
 305 310 315 320
 Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
 325 330 335
 Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
 340 345 350
 Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
 355 360 365
 Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
 370 375 380
 Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
 385 390 395 400
 Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
 405 410 415
 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
 420 425 430
 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile 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> 231
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-505 de HuPH20 madura

10

<400> 231

```

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
    
```


ES 2 566 549 T3

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										

<210> 232
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-503 de HuPH20 madura

10

<400> 232

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

ES 2 566 549 T3

<210> 233
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-501 de HuPH20 madura

10

<400> 233

```

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
    
```

ES 2 566 549 T3

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										460	
Phe	Leu															
465																

<210> 234
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-499 de HuPH20 madura

10

<400> 234

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

 Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
 245 250 255
 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

ES 2 566 549 T3

<210> 235
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-497 de esHuPH20

10

<400> 235

```

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
    
```

ES 2 566 549 T3

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

<210> 236
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-495 de esHuPH20

10

<400> 236

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

ES 2 566 549 T3

<211> 458
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> 36-493 de esHuPH20

<400> 237

```

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
    
```

10

ES 2 566 549 T3

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

<210> 238
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-491 de esHuPH20

10

<400> 238

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

 Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
 115 120 125
 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

ES 2 566 549 T3

<210> 239
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-489 de HuPH20 madura

10

<400> 239

```

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> 240
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-490 de HuPH20 madura

10

<400> 240

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

ES 2 566 549 T3

<211> 452
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<223> 36-487 de HuPH20 madura

<400> 241

10 **Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp**
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro

```

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

```

<210> 242
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>

<223> 36-485 de HuPH20 madura

<400> 242

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> 243
 <211> 449

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<223> 36-484 de HuPH20 madura

<400> 243

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> 244
 <211> 441
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 36-476 de HuPH20 madura

5

<400> 244

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> 245
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> 36-475 de HuPH20 madura

5 <400> 245

```

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
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
    
```

ES 2 566 549 T3

435

440

5
<210> 246
<211> 439
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10
<220>
<223> 36-474 de HuPH20 madura
<400> 246

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> 247
 <211> 438
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 36-473 de HuPH20 madura

5

<400> 247

```

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

```

ES 2 566 549 T3

				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														

5
<210> 248
<211> 437
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10
<220>
<223> 36-472 de HuPH20 madura
<400> 248

ES 2 566 549 T3

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

<210> 249
 <211> 436
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 36-471 de HuPH20 madura

5

<400> 249

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

ES 2 566 549 T3

	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													

5 <210> 250
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> 36-470 de HuPH20 madura
 <400> 250

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> 251
<211> 434

ES 2 566 549 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

5 <223> 36-469 de HuPH20 madura

<400> 251

```

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

```


ES 2 566 549 T3

			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> 252
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-468 de HuPH20 madura

10

<400> 252

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> 253
 <211> 431
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 36-466 de HuPH20 madura

5

<400> 253

```

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

```

ES 2 566 549 T3

				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
					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> 254
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-465 de HuPH20 madura

10

<400> 254

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
						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> 255
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> 36-464 de HuPH20 madura

<400> 255

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
 420          425
    
```

ES 2 566 549 T3

<210> 256
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-462 de HuPH20 madura

10

<400> 256

```

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
    
```

ES 2 566 549 T3

				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> 257
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-460 de HuPH20 madura

10

<400> 257

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

 Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
 325 330 335
 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> 258
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> 36-458 de HuPH20 madura

<400> 258

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									
			420												

ES 2 566 549 T3

<210> 259
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-456 de HuPH20 madura

10

<400> 259

```

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
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
    
```

ES 2 566 549 T3

				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												

5 <210> 260
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> 36-454 de HuPH20 madura
 <400> 260

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

 Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
 325 330 335
 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> 261
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> 36-452 de HuPH20 madura

<400> 261

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															

<210> 262

<211> 415
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> 36-450 de HuPH20 madura

<400> 262

```

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
    
```

10

ES 2 566 549 T3

<210> 263
<211> 473
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<220>
<223> 36-508 de HuPH20 madura

10 <400> 263

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

ES 2 566 549 T3

<210> 264
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-506 de HuPH20 madura

10

<400> 264

```

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
    
```

ES 2 566 549 T3

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> 265
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-504 de HuPH20 madura

10

<400> 265

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

ES 2 566 549 T3

<210> 266
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-502 de HuPH20 madura

10

<400> 266

```

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> 267
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-500 de HuPH20 madura

10

<400> 267

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

ES 2 566 549 T3

<210> 268
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-498 de HuPH20 madura

10

<400> 268

```

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> 269
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> 36-496 de esHuPH20

10

<400> 269

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

ES 2 566 549 T3

<211> 459
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<223> 36-494 de esHuPH20

<400> 270

10 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> 271
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> 36-492 de esHuPH20

<400> 271

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> 272
 <211> 453
 <212> PRT

ES 2 566 549 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 36-488 de HuPH20 madura

5

<400> 272

```

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
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> 273
 <211> 451
 <212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 36-486 de HuPH20 madura

5

<400> 273

```

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
    
```

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - 5 una cantidad terapéuticamente eficaz de una hialuronidasa; y
lisil lisina (Lys-Lys) en una cantidad suficiente para hacer que la hialuronidasa sea estable.
 2. La composición de la reivindicación 1, en donde la concentración de Lys-Lys es de entre 5 mM y 300 mM.
 - 10 3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la concentración de Lys-Lys es de entre 5 mM y 120 mM.
 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el pH de la formulación es de entre 6,5 a 8,0, incluidos.
 - 15 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la composición comprende además uno o más de un agente estabilizante, un antioxidante y un modificador de la tonicidad para mantener la osmolalidad a entre 245 mOsm/kg a 500 mOsm/kg, incluidos.
 - 20 6. La composición de la reivindicación 5, en donde una composición comprende un agente estabilizante y el agente estabilizante se selecciona de entre un aminoácido, un derivado de aminoácido, una amina, un azúcar, un poliol, una sal y un tensioactivo.
 7. La composición de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el agente estabilizante es un tensioactivo y la cantidad de tensioactivo, como un % de concentración en masa (p/v) en la formulación, es de entre el 0,0005 % al 1,0 %, incluidos.
 - 25 8. La composición de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde la composición comprende un tensioactivo y el tensioactivo se selecciona de entre poloxamer 188, polisorbato 20 y polisorbato 80.
 - 30 9. La composición de la reivindicación 5, en donde la composición comprende un antioxidante y el antioxidante se selecciona de entre cisteína, triptófano y metionina.
 10. La composición de la reivindicación 5 o la reivindicación 9, en donde el antioxidante está a una concentración de entre 5 mM a 50 mM, incluidos.
 - 35 11. La composición de la reivindicación 5, en donde la composición comprende un modificador de la tonicidad y el modificador de la tonicidad se selecciona de entre glicerina, sal, aminoácidos, polialcoholes y trehalosa.
 - 40 12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la hialuronidasa es activa a pH neutro.
 13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde:
 - 45 la hialuronidasa carece de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) o no está asociada a membrana cuando se expresa por una célula; o
la hialuronidasa contiene truncamientos C-terminales de uno o más restos de aminoácidos para eliminar la totalidad o parte de un anclaje de GPI.
 - 50 14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la hialuronidasa es una PH20 o un fragmento truncado en C-terminal de la misma.
 15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la hialuronidasa es un polipéptido de PH20 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9, 47-48, 234-254, y 267-273, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 85 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 4-9, 47-48, 234-254, y 267-273.
 - 55 16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde la actividad de hialuronidasa es de entre 50 U/ml a 5000 U/ml, incluidos.
 - 60 17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la concentración de Lys-Lys es de entre 5 mM a 50 mM, incluidos.
 18. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde:
 - 65 el pH de la composición es de entre 6,5 a 7,2;
y la composición comprende:

- una hialuronidasa en una cantidad que es de entre 100 U/ml a 500 U/ml, incluidos;
 Lys-Lys a una concentración que es de entre 5 mM a 30 mM, incluidos;
 NaCl a una concentración menor de 140 mM de NaCl;
 un tensioactivo que es polisorbato 80 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre el 0,01 %
 5 al 0,05 %, incluidos;
 metionina a una concentración que es de entre 5 mM a 20 mM, incluidos; y
 fosfato de sodio a una concentración que es de entre 5 mM a 50 mM, incluidos.
19. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, que además comprende una insulina de acción
 10 rápida.
20. La composición de la reivindicación 19, en donde la insulina de acción rápida es un análogo de insulina de
 acción rápida seleccionado de entre insulina aspart, insulina lispro e insulina glulisina.
- 15 21. La composición de la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en donde la cantidad de insulina de acción rápida
 es de entre 10 U/ml a 1000 U/ml, incluidos.
22. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en donde:
- 20 la insulina de acción rápida es un análogo de insulina que es glulisina y la concentración de Lys-Lys es de 50 a
 105 mM; o
 la insulina de acción rápida es un análogo de insulina que es insulina aspart o insulina lispro y la concentración
 de Lys-Lys es de 80 a 100 mM.
- 25 23. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde la composición es para administración
 multidosis y comprende una cantidad antimicrobianamente eficaz de un conservante o mezcla de conservantes.
24. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la composición se selecciona de entre una
 30 composición en la que:
- a) el pH de la composición es de entre 6,8 a 7,4; y
 la composición comprende:
- 35 una hialuronidasa que es una PH20 en una cantidad de entre 100 U/ml a 1000 U/ml, incluidos;
 un análogo de insulina de acción rápida que es insulina glulisina en una cantidad de entre 10 U/ml a 1000
 U/ml, incluidos;
 Lys-Lys a una concentración de entre 50 mM a 105 mM, incluidos;
 NaCl a una concentración de menos de 100 mM;
 un tensioactivo que es polisorbato 20 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre el
 40 0,0005 % al 0,005 %, incluidos;
 metionina a una concentración de entre 5 mM a 20 mM, incluidos; y
 un conservante que contiene fenol a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre el 0,1 % al
 0,25 % y m-cresol a un % p/v de entre el 0,05 % al 0,2 %; o
- 45 b) el pH de la composición es de entre 6,8 a 7,4; y la composición comprende:
- una hialuronidasa que es una PH20 en una cantidad de entre 100 U/ml a 1000 U/ml, incluidos;
 un análogo de insulina que es insulina aspart o insulina lispro en una cantidad de entre 10 U/ml a 1000 U/ml,
 incluidos;
 50 Lys-Lys a una concentración de entre 80 mM a 100 mM, incluidos;
 NaCl a una concentración de menos de 30 mM;
 un tensioactivo que es polisorbato 20 a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre el
 0,0005 % al 0,005 %, incluidos;
 metionina a una concentración de entre 5 mM a 20 mM, incluidos; y
 55 un conservante que contiene fenol a un porcentaje (%) de concentración en masa (p/v) de entre el 0,1 % al
 0,25 % y m-cresol a un % p/v de entre el 0,05 % al 0,2 %.
25. Una jeringuilla o vial, que comprende una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-24.
- 60 26. Un sistema de bucle cerrado, bomba de insulina o bolígrafo de insulina, que comprende una composición de
 cualquiera de las reivindicaciones 19-24.
27. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 19-24 para su uso en el tratamiento de la diabetes o para
 su uso en el control de los niveles de glucosa en sangre en un sujeto.
- 65

28. La composición de la reivindicación 27, en donde la diabetes se selecciona de entre diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y diabetes gestacional.