PCT

INVENTARIO

OK

Industria y Comercio

SUPERINT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111104- -00000-0000
Fecha: 2010-09-08 14:56:38 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 640

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

10-111104

21. **EXPEDIENTE Nº**

54. **TÍTULO** **COMBINACIONES Y METODOS PARA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE INMUNOGLOBULINA Y HIALURONIDASA.**

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K 39/395

71. **SOLICITANTE** **Baxter Healthcare, S.A., Baxter International, Inc y Halozyme, Inc.**

DOMICILIO Glattpark (Opfikon), Suiza. // Deerfield, Illinois, Estados Unidos. y San Diego, California 92121 Estados Unidos.

74. **APODERADO** DILIA MARIA RODRIGUEZ D´ALEMAN

22. **BOGOTÁ, D.C.**

Pida, Cite, Anexe
17-10-2010

119

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111104- -00000-0000
Fecha: 2010-09-08 14:56:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 640

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad

[ ] Capitulo I. [X] Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **Baxter Healthcare, S.A., Baxter International, Inc y Halozyme, Inc.**
Dirección: Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), Suiza. // One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015, Estados Unidos. y 11388 Sorrento Valley Road, San Diego, California 92121 Estados Unidos.
Nacionalidad o domicilio: Zurich, Suiza, Deerfield, Illinois, Estados Unidos y San Diego, California, Estados Unidos de América.
Lugar de Constitución:
Teléfono: **Fax:**
E-mail

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Número

3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN
Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6
Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824
E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Número 41.654.882 TP 20824

4 INVENTOR (ES) (72)

Nombre: **VER HOJA ANEXA**
Dirección:
Nacionalidad o domicilio:

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2009/001670** Fecha **16 de marzo de 2009**
Publicación Internacional No. **WO 2009/117085 A1** Fecha **24 de septiembre de 2009**

6 TITULO (54) **COMBINACIONES Y METODOS PARA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE INMUNOGLOBULINA Y HIALURONIDASA.**

7 Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

8 Prioridad SI [X] NO [ ]	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	Estados Unidos de América	**17 de marzo de 2008**	**61/069,841**

9 Comprobante de pago No. 10-63.111 // 10-63.112 // 10-71.073 // 10-71.074 // 10-71.184 // 10-71.271 //10-71.272
Fecha 03/08/10 // 03/08/10 // 27/08/10 // 27/08/10 // 27/08/10 // 27/08/10 // 27/08/10

10 ANEXOS

- [ ] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [ ] Poderes si fuere el caso
- [x] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso copia de contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- [ ] Arte final 12 X 12 .
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- [ ] Otros Opinión escrita. *Notificación de un cambio de domicilio de uno de los titulares.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA

12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 T.P. 20824

As. P-2643

ANEXOS

INVENTORES

1.) SCHIFF, Richard

(12916 Sunny Lane, nta Rosa Valley, California 93012, Estados Unidos de América);

2.) LEIBL, Heinz

(K nger Gasse 12, A-1120 Vienna, Austria);

3.) FROST, Gregory, I.

(13662 Mercado ve, Del Mar, California 92014, Estados Unidos de América).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 63,111
FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111104- -00000-0000
Fecha: 2010-09-08 14:56:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 640

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	500,000.00
		TOTAL : $	500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

3

P-2643

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 63,112
FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111104- -00000-0000
Fecha: 2010-09-08 14:56:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 640

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	500,000.00
		TOTAL : $	500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 71,073
FECHA : AGOSTO 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111104- -00000-0000
Fecha: 2010-09-08 14:56:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 640

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353156554	26/08/2010	85,505,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	500,000.00
		TOTAL : $	500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 71,074
FECHA : AGOSTO 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111104- -00000-0000
Fecha: 2010-09-08 14:56:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 640

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353156554	26/08/2010	85,505,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	500,000.00
		TOTAL : $	500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 71,184
FECHA : AGOSTO 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111104- -00000-0000
Fecha: 2010-09-08 14:56:38 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 640

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353156554	26/08/2010	85,505,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	100,000.00
		TOTAL : $	100,000.00

SON: CIEN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 71,271
FECHA : AGOSTO 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111104- -00000-0000
Fecha: 2010-09-08 14:56:38 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 640

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353156554	26/08/2010	85,505,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS		20,000.00
		TOTAL :	$	20,000.00

SON: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 71,272
FECHA : AGOSTO 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111104- -00000-0000
Fecha: 2010-09-08 14:56:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 640

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353156554	26/08/2010	85,505,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	20,000.00
		TOTAL : $	20,000.00

SON: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

9

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan combinaciones, composiciones y equipos que contienen una composición de inmunoglobulina (IG) y una composición de hialuronidasa soluble formulada para administración subcutánea. Dichos productos pueden ser usados en métodos de tratar enfermedades o condiciones tratables con IG. También se proporcionan métodos para administración subcutánea de inmunoglobulina, con los cuales el régimen de dosificación es sustancialmente el mismo que para administración intravenosa de la misma dosificación para tratamiento de la misma enfermedad o condición tratable con IG.

10

COMBINACIONES Y METODOS PARA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE INMUNOGLOBULINA Y HIALURONIDASA

SOLICITUDES RELACIONADAS

Se reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de E.U.A. No. de Serie 61/069,841, para Richard Schiff, Heinz Leibl and Gregory Frost, titulada "Combinations and Methods for Subcutaneous Administration of Immune Globulin and Hyaluronidase", presentada el 17 de marzo de 2008. Donde se permite, la materia objeto de la solicitud antes notada se incorpora para referencia en su totalidad.

Esta solicitud se relacionada a la Solicitud E.U.A. No. de Serie 12/381,844, presentada el mismo día que la adjunta, titulada "Combinations and Methods for Subcutaneus Administration of Immune Globulin and Hyaluronidase", que reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de E.U.A. No. de Serie 61/069,841. Donde se permite, la materia objeto de la solicitud antes notada se incorpora para referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan combinaciones, composiciones y equipos que contengan una composición de inmunoglobulina (IG) y una composición de hialuronidasa soluble formulada para administración subcutánea. Dichos productos pueden ser usados en métodos de tratar condiciones o enfermedades tratables

con IG. También se proporcionan métodos para administración subcutánea de inmunoglobulinas con los cuales el régimen de dosificación es sustancialmente el mismo que para administración intravenosa de la misma dosificación para tratamiento de la misma enfermedad o condición tratable con IG.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La administración intravenosa (IV) de inmunoglobulina (IVIG, siglas del inglés IntraVenous Immune Globuline) es el tratamiento primario de individuos con deficiencias inmunes. Aunque las preparaciones iniciales de IVIG causaron severos efectos secundarios, las preparaciones de IVIG disponibles actualmente son bien toleradas en la mayoría de pacientes inmunodeficientes. No obstante, una pequeña proporción de pacientes continúa teniendo reacciones desagradables, aún inhabilitadoras, como jaqueca, fatiga, y mialgia. Fiebre y escalofríos permanecen siendo un problema, especialmente cuando los pacientes tienen infecciones intercurrentes. Las reacciones, a menudo persisten a pesar de intentar otras preparaciones de IVIG o pre-medicar con acetaminofeno, difenhidramina, y corticoesteroides. Adicionalmente, debido al requerimiento por la administración IV, existen resultados con la aceptación de pacientes.

12

La administración subcutánea (SC) de inmunoglobulina es una alternativa a la administración intravenosa. Comparada con infusiones IV, la administración SC de inmunoglobulina tiene varias ventajas. Por ejemplo, reduce la incidencia de reacciones generalizadas, no requiere acceso IV algunas veces difícil, mejora los niveles mínimos, y da a los pacientes más independencia. A causa de la dificultad en administrar grandes cantidades de fluido en un solo sitio, es necesario hacer infusiones SC una o dos veces por semana, usando dos o tantos como 5 sitios a la vez. Así, a diferencia de IVIG, el cual es dado una vez al mes, la administración subcutánea es hecha usualmente semanalmente. Por consiguiente, hay una necesidad por métodos alternativos para administrar inmunoglobulina.

SUMARIO DE LA INVENCION

Se proporcionan en la presente métodos, composiciones, combinaciones y equipos para administración subcutánea de inmunoglobulina y para tratar condiciones o enfermedades tratables con IG. Se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o condición tratable con IG en un sujeto administrando subcutáneamente al sujeto hialuronidasa soluble y una inmunoglobulina (IG) para tratar la enfermedad o condición. La co-administración de IG y hialuronidasa incrementa la biodisponibilidad de IG administrada

13

subcutáneamente para permitir la administración de IG subcutáneamente usando un régimen de dosificación sustancialmente igual a la administración intravenosa de IG (IVIG) para la enfermedad o condición particular. La administración de la IG es efectuada de modo que la cantidad administrada y la frecuencia de la administración es sustancialmente la misma que para administración IV (intravenosa) de la misma cantidad vía IV para la misma enfermedad o condición. La cantidad administrada vía IV puede ser pre-determinada o es conocida para una enfermedad o condición. Típicamente, en la presencia de una hialuronidasa soluble, para administración subcutánea, la velocidad de administración puede ser mayor que para administración IV. Por consiguiente, el tiempo para administración de una dosis particular puede ser reducido. La velocidad de administración puede ser controlada, por medio de una bomba o puede efectuarse por gravedad.

Así, entre los métodos proporcionados están métodos para tratar una enfermedad o condición tratable por IG en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento por administración subcutánea al sujeto de una hialuronidasa soluble y una cantidad de inmunoglobulina (IG) efectiva para tratar la enfermedad o condición. La administración es efectuada con un régimen de dosificación en el cual: (a) una cantidad de IG; y

14

(b) una frecuencia de dosificación para administraciones sucesivas de IG al sujeto son seleccionadas de modo que el efecto terapéutico de la administración subcutánea de IG en el sujeto es al menos sustancialmente equivalente a la administración intravenosa de la IG al sujeto usando el mismo régimen de dosificación.

En algunos ejemplos de los métodos proporcionados en la presente, la biodisponibilidad de la IG administrada subcutáneamente es al menos de aproximadamente 90 % de la biodisponibilidad de la misma dosificación administrada vía administración IV. La cantidad de hialuronidasa soluble administrada puede ser suficiente para efectuar administración subcutánea de la IG a una dosificación administrada no más de una vez al mes. En otros ejemplos, la administración de IG no es más de una vez mensualmente.

La hialuronidasa soluble usada en los métodos proporcionados en la presente puede ser PH20 o una forma truncada de ésta. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede ser una PH20 ovina o bovina o humana truncada. En casos en donde se usa una PH20 humana truncada en los métodos y usos proporcionados en la presente, la PH20 humana truncada puede ser seleccionada de entre polipéptidos que tengan una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NOS: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de éstas.

15

En un ejemplo, la hialuronidasa soluble es rHuPH20.

La IG administrada usando los métodos y usos de la presente puede ser purificada a partir de plasma humano, como por fraccionamiento en medio alcohólico. En algunos ejemplos, la IG es adicionalmente purificada por medio de cualquiera de una o más de una modificación química, incubación a pH de 4.0 con o sin pepsina, precipitación con polietilenglicol (PEG), cromatografía por intercambio iónico, fraccionamiento enzimático, tratamiento con detergente como solvente, diafiltración o ultrafiltración. Los métodos y usos proporcionados en la presente pueden emplear IG que contenga IgG, IgA e IgM. En algunos ejemplos, la IG contiene más de 95 % de IgG. Adicionalmente, la IgG puede ser monomérica. También pueden estar presentes en la IG excipientes estabilizantes de proteínas, como uno o más de glicina, maltosa, un poliol, albúmina de suero humano, manitol, y detergente no iónico. En algunos ejemplos, el pH de la preparación de IG está en o es de aproximadamente 4.2 a 5.4, 4.6 a 5.1 o 4.8 a 5.0, y la concentración de proteína es de aproximadamente 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de composición de IG. En un ejemplo, la concentración de proteínas de la IG es de 10 % en peso/volumen.

Se proporcionan en la presente métodos y usos para

16

tratar una enfermedad o condición tratable por IG, en la cual hialuronidasa soluble y una inmunoglobulina (IG) para tratar la enfermedad o condición son administradas subcutáneamente, y la IG es infusionada a una velocidad de 10 mL/hr a 300 mL/hr, como en o aproximadamente 10 mL/hr, 20 mL/hr, 30 mL/hr, 40 mL/hr, 50 mL/hr, 60 mL/hr, 70 mL/hr, 80 mL/hr, 90 mL/hr, 100 mL/hr, 150 mL/hr, 200 mL/hr, 250 mL/hr y 300 mL/hr. La velocidad puede ser controlada por medio de una bomba o por gravedad. En algunos ejemplos, la IG y la hialuronidasa son administradas separada, simultánea o intermitentemente. Por ejemplo, la hialuronidasa puede ser administrada antes de administración de la IG, como 0.5 minutos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 20 minutos o minutos antes de la administración de la IG. En otros ejemplos, la IG y la hialuronidasa están en una composición individual. En ejemplos adicionales, aproximadamente o 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g o 40 g de IG son administrados, y la hialuronidasa es administrada en una proporción (unidades de hialuronidasa /gramos de IG) de o aproximadamente 10 U/gramo (g), 20 U/g, 30, 35 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 300

17

U/g.

La hialuronidasa soluble y la IG pueden ser administradas usando los métodos y usos proporcionados en la presente para tratar, por ejemplo, inmunodeficiencia; hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP, siglas del inglés Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy); Síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada ANCA positiva; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT, siglas del inglés Foeto-Maternal AlloImmune Thrombocytopenia/Neonatal AlloImmune Thrombocytopenia); síndrome hemofagocítico; trasplante de células embrionarias hemopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatías para-proteinémicas de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia de mioclonus

opsoclonus; pénfigus foliáceo; pénfigus vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS, siglas del inglés Toxic Epidermal Necrolysis/Steven Johnson Syndrome); síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica. En los casos en los que se administra IG y hialuronidasa para tratar una inmunodeficiencia, la inmunodeficiencia puede ser seleccionada de entre inmunodeficiencia variable común (CVID, siglas del inglés Common Variable ImmunoDeficiency), agamaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada severa (SCID, siglas del inglés Severe Combined ImmunoDeficiency), hipogamaglobulinemia primaria, enfermedades por inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agamaglobulinemia congénita o ligada al cromosoma X (XLA, siglas del inglés X-Linked Agammaglobulinemia), hipogamaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebélica paraneoplástica sin anticuerpos.

En casos en donde la enfermedad o condición tratable con IG es hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas, y la malignidad hematológica puede ser leucemia linfocítica crónica (CLL, siglas del inglés Chronic Lynphocytic Leukemia), mieloma múltiple (MM,

siglas del inglés Multiple Myeloma), o linfoma diferente al de Hodgkin (NHL, siglas del inglés Non-Hodgkin's Lymphoma). En casos en donde la enfermedad o condición tratable con IG es una miopatía inflamatoria, la miopatía inflamatoria puede ser polimiositis, dermatomiositis o miositis corporal por inclusión.

En algunos ejemplos, la hialuronidasa soluble y la IG son administradas subcutáneamente para tratar una condición bacteriana, viral o fúngica, como, por ejemplo *Haemophilus influenzae* de typo B, *Pseudomonas aeruginosa* de tipos A y B, *Staphylococcus aureus, Streptococcus* del Grupo B, *Streptococcus penumoniae* de los tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23, Adenovirus de los tipos 2 y 5, Citomegalovirus, virus VCA de Epstein Barr, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, influenza A, sarampión, parainfluenza de tipos 1, 2 y 3, polio, virus de varicela zóster, *Aspergillus* y *Candida albicans*.

Se proporcionan en la presente combinaciones de composiciones, que contienen una primera composición que contiene IG formulada para administración subcutánea de dosificación individual no más de una vez al mes, y una segunda composición que contiene una hialuronidasa soluble formulada para administración de dosificación individual no

20

más de una vez al mes. Las composiciones pueden estar en un contenedor de cámara dual o en dos contenedores individuales separados entre sí. En algunos ejemplos, la hialuronidasa es posicionada en el contenedor para ser administrada antes de la IG. El contenedor puede ser una jeringa, tubo o botella, y puede contener adicionalmente una aguja para inyección.

Las combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente pueden contener PH20, o una forma truncada de ésta. Por ejemplo, PH20 ovina, bovina o humana truncada, como un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NOS: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de éstas, pueden ser incluidas en las combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente. En algunos ejemplos, la hialuronidasa soluble en la combinación es rHuPH20. Adicionalmente la IG en las combinaciones de composiciones puede ser purificada a partir de plasma humano y puede ser liofilizada o un líquido.

En algunos ejemplos, el volumen de líquido en las combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente es o es de aproximadamente 100 m, 150 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL o 700 mL. La IG en las combinaciones de composiciones puede tener una concentración de proteínas que es o es aproximadamente de 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de composición de

IG, como por ejemplo 10 % en peso/volumen. En algunos ejemplos, la IG en la composición es o es de aproximadamente 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g, o 40 g. La hialuronidasa puede ser un líquido. En algunos ejemplos, el volumen de la hialuronidasa líquida es o es aproximadamente de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 20 mL, o 30 mL, y la hialuronidasa está en o es aproximadamente de 10 Unidades a 500,000 Unidades, 100 Unidades a 100,000 Unidades, 500 Unidades a 50,000 Unidades, 1,000 Unidades a 10,000 Unidades, 5,000 Unidades a 7,500 Unidades, 5,000 Unidades a 50,000 Unidades 1,000 Unidades a 10,000 Unidades.

Se proporcionan en la presente composiciones que contienen inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa soluble formulada para una administración en dosificación unitaria una vez al mes. La hialuronidasa soluble contenida en la composición puede ser PH20, o una forma truncada de ésta. Por ejemplo, PH20 ovina, bovina, o humana truncada, como un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NOS: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de éstas, pueden ser incluidas en las composiciones formuladas para la administración en dosificación individual proporcionada en la presente. En

algunos ejemplos, la hialuronidasa soluble en la composición es rHuPH20. La IG en las composiciones puede ser purificada a partir de plasma humano, y puede ser un líquido

En modalidades ejemplares, la IG en las composiciones formuladas para administración en dosificación individual proporcionada en la presente tiene una concentración de proteínas que es o es de aproximadamente 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de la composición de IG, como por ejemplo, 10 % en peso/volumen. La IG en la composición es o es de aproximadamente 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g, 40 g, y la hialuronidasa es de o es de aproximadamente 10 Unidades a 500,000 Unidades, 100 Unidades a 100,000 Unidades, 500 Unidades a 50,000 Unidades, 1,000 Unidades a 10,000 Unidades, 5,000 Unidades a 7,500 Unidades, 5,000 Unidades a 50,000 Unidades o 1,000 Unidades a 10,000 Unidades. El volumen de líquido en la composición puede ser de aproximadamente 100 mL, 150 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, o 700 mL.

Se proporcionan en la presente equipos que contienen combinaciones de composiciones, que contienen una primera composición que contiene IG formulada para administración en dosificación individual subcutánea no más

de una vez al mes, y una segunda composición que contiene una hialuronidasa soluble formulada para administración en dosificación individual no más de una vez al mes. También se proporcionan en la presente composiciones que contienen inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa soluble formulada para administración en dosificación individual una vez al mes. Opcionalmente, pueden incluirse en los equipos, instrucciones.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Indice

A. Definiciones

B. Administración Subcutánea de Inmunoglobulina (IG)

C. Inmunoglobulina

D. Hialuronidasa

PH20 Humana Soluble

PH20 Recombinante Soluble (rHuPH20)

E. Métodos de Producir Acidos Nucleicos que codifican a una Hialuronidasa Soluble y a Polipéptidos de Esta.

1. Vectores y Células

2. Expresión

a. Células Procarióticas

b. Células de Levaduras

c. Células de Insectos

d. Células de Mamíferos

e. Plantas

3. Técnicas de Purificación

F. Preparación, Formulación y Administración de Inmunoglobulinas y Polipéptidos de Hialuronidasa Soluble

1. Formulaciones

Polvos liofilizados

2. Dosificación y Administración

G. Métodos de Evaluar la Actividad, Biodisponibilidad y Farmacocinética

1. Farmacocinética y Tolerancia

2. Actividad Biológica

a. Inmunoglobulina

b. Hialuronidasa

H. Usos Terapéuticos

1. Inmunodeficiencia Primaria con Deficiencia de Anticuerpos

2. Hipogamaglobulinemia Secundaria Adquirida en Malignidades Hematológicas

3. Enfermedad de Kawasaki

4. Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica

5. Síndrome de Guillain-Barre

6. Púrpura Trombocitopénica Idiopática

7. Miopatías Inflamatorias: polimiositis, dermatomiositis y miositis corporal por inclusión

8. Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton

9. Neuropatía Motora Multi-focal

11. Síndrome de Moersch-Woltzmann

12. Enfermedad de Alzheimer

13. Otras Enfermedades y Condiciones

I. Artículos de fabricación y equipos

J. Ejemplos.

A.DEFINICIONES

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que comprende comúnmente un experto en el arte al cual pertenece la invención. Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes y publicadas, publicaciones, secuencias de GenBank, bases de datos, sitios de red y otros materiales publicados mencionados en el transcurso de la descripción entera de la presente, a menos que se indique de otra manera, son íntegramente incorporadas como referencia. En el caso en el que haya una pluralidad de definiciones para términos en la presente, prevalecen los de esta sección. Donde se haga referencia a una URL u otro identificador o dirección tal, se comprende que dichos

identificadores pueden cambiar y la información particular en la "internet" puede ir y venir, pero la información equivalente puede ser encontrada por búsqueda en "internet". Referencia a estas evidencias, la disponibilidad y diseminación pública de dicha información

Como se usa en la presente, "inmunoglobulina", "globulina inmune", "gama globulina", se refieren a preparaciones de proteínas plasmáticas derivadas del plasma conjuntado de donadores adultos. Los anticuerpos IgG predominan; están presentes otras subclases de anticuerpos, como IgA e IgM. La inmunoglobulina terapéutica puede proporcionar inmunización pasiva al aumentar los niveles de suero del receptor de anticuerpos circulantes. Los anticuerpos IgG pueden, por ejemplo, enlazar a y neutralizar toxinas bacterianas; opsonizar patógenos; activar complemento; y suprimir citoquinas patógenas y fagocitos a través de la interacción con citoquinas y receptores de éstos, como CD5, interleuquina-1a (IL-1a), interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis de tumor-alfa (TNF-alfa), y receptores de células T. Las inmunoglobulinas terapéuticas pueden inhibir la actividad de autoanticuerpos. Preparaciones de inmunoglobulina también incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulina intravenosa (IGIV), inmunoglobulina IV, inmunoglobulina terapéutica. Las preparaciones de

inmunoglobulina son bien conocidas, e incluyen nombres comerciales, como BayGam®, Gamimune®N, Gammagard® S/D, Gamma®-P, Iveegam®EN, Panglobulin®, Polygam®S/D, Sandoglobulin®, Venoglobulin®-1, Venoglobulin®-S, WinRho®SDF y otros. Las preparaciones de inmunoglobulina pueden ser derivadas de plasma humano, o ser producidas de manera recombinante.

Como se usa en la presente enfermedades o condiciones tratables con IG se refiere a cualquier enfermedad o condición para la cual son usadas las preparaciones de inmunoglobulina. Dichas enfermedades y condiciones incluyen, pero no se limitan a, cualquier enfermedad en la cual un incremento en anticuerpos circulantes es mejoradora, como, por ejemplo, inmunodeficiencia, hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); Síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada ANCA positiva; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa;

28

penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células embrionarias hemopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatías para-proteinémicas de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia de mioclonus opsoclonus; pénfigus foliáceo; pénfigus vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

Como se usa en la presente, régimen de dosificación se refiere a la cantidad de inmunoglobulina administrada y a la frecuencia de administración. El régimen de dosificación es una función de la enfermedad o condición a ser tratada, y por consiguiente puede variar.

Como se usa en la presente, "sustancialmente el mismo que un régimen de dosificación intravenosa de IG (IVIG)", se refiere a un régimen en el cual la dosis y/o la frecuencia está en una cantidad que es efectiva para tratar una enfermedad o condición particular, típicamente es de aproximadamente 0 10 %, de la dosis o frecuencia IV.

Cantidades de IVIG que son efectivas para tratar una enfermedad o condición particular son conocidas o pueden ser determinada empíricamente por un experto en el arte. Por ejemplo, como se ejemplifica posteriormente, 300 mg/kg (es decir 21 gramos asumiendo los pesos del adulto promedio de 70 kg) a 600 mg/kg (es decir 42 gramos) es la dosis mensual típica de IVIG administrada a pacientes que tienen enfermedades por inmunodeficiencia. Por lo tanto, IG, cuando se administra en combinación con hialuronidasa, es administrada subcutáneamente a dosis que son o son aproximadamente 300 mg/kg a 600 mg/kg para el tratamiento de enfermedades por inmunodeficiencia primaria.

Como se usa en la presente, frecuencia de administración se refiere al tiempo entre dosis sucesivas de inmunoglobulina. Por ejemplo, frecuencia puede ser una, dos, tres, cuatro semanas, y es una función de la enfermedad o condición particular tratada. Generalmente, frecuencia es al menos cada dos o tres semanas, y típicamente no mas de una vez al mes.

Como se usa en la presente, hialuronidasa se refiere a una enzima que degrada el ácido hialurónico. Hialuronidasa incluye hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos, y crustáceos (EC 3.2.1.36), y hialuronidasas de tipo de

mamífero (EC 3.2.1.35). Hialuronidasas también incluye cualquiera de origen no humano incluyendo, pero no limitándose a, roedor, canino, felino, leprino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, de peces, de ranas, bacteriano, y de sanguijuelas, otros parásitos, crustáceos. Hialuronidasas no humanas ejemplares incluyen, hialuronidasas de vacas (SEC ID NO: 10 y 11), avispa social del género vespa (SEC ID NOS: 12 y 13), abeja de miel (SEC ID NO: 14), avispón de cara blanca (SEC ID NO: 15), avispa papelera (SEC ID NO: 16), ratón (SEC ID NOS: 17-19, 32), cerdo (SEC ID NOS: 20-21), rata (SEC ID NOS: 22-24,31), conejo (SEC ID NO: 25), oveja (SEC ID NO: 26 y 27), orangután (SEC ID NO: 28), mono cynomolgus (SEC ID NO: 29), cobayo (SEC ID NO: 30), *Staphylococcus aureus* (SEC ID NO: 33), *Streptococcus pyogenes* (SEC ID NO: 34), *y Clostridium perfringens* (SEC ID NO: 35). Las hialuronidasas también incluyen las de origen humano. Las hialuronidasas humanas ejemplares incluyen HYAL1 (SEC ID NO: 36), HYAL2 (SEC ID NO: 37), HYAL3 (SEC ID NO: 38), HYAL4 (SEC ID NO: 39), y PH20 (SEC ID NO: 1). También están incluidas entre las hialuronidasas las hialuronidasas solubles, incluyendo PH20 ovina y bovina, PH20 humana soluble y rHuPH20 soluble.

La referencia a hialuronidasas incluye polipéptidos de hialuronidasa precursores y polipéptidos de hialuronidasa

maduros (como aquellos en los cuales una ha sido retirada una secuencia de señal), formas truncadas de éstos que tengan actividad, e incluye las variantes alélicas y especies variantes, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 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 SEC ID NOS: 1 y 10-39, o con la forma madura de éstos. Por ejemplo, la referencia ala hialuronidasa también incluye variantes del polipéptido precursor de PH20 humana expuestas en las SEC ID NOS: 50-51. Las hialuronidasas también incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o post-traslacionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o post-translacionales. Dichas modificaciones incluye, pero no se limitan a, PEGilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en el arte.

Como se usa en la presente, una hialuronidasa soluble se refiere a un polipéptido caracterizado por su solubilidad bajo condiciones fisiológicas. Las hialuronidasas solubles pueden ser diferenciadas , por ejemplo, por su separación en la fase acuosa de una solución de Triton X-114

calentada a 37 °C (Bordier y colaboradores, (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7). Fijadas a membrana, como hialuronidasas fijadas en lípido, se separarán en la fase rica en detergente, pero se separarán en la fase acuosa o pobre en detergente después de tratamiento con Fosfolipasa-C. Se incluyen entre las hialuronidasas solubles las hialuronidasas fijadas a membrana en las cuales una o más regiones asociadas con la fijación de la hialuronidasa a la membrana ha sido removida o modificada, donde la forma soluble retiene la actividad hialuronidasa. Las hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas solubles recombinantes y aquellas contenidas en o purificadas a partir de fuentes naturales, como por ejemplo, extractos de testículo de oveja o vaca. Son ejemplares de hialuronidasas solubles la PH20 humana soluble. Otras hialuronidasas solubles incluyen PH20 ovina (SEC ID NO: 27) y bovina (SEC ID NO: 11).

Como se usa en la presente, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluye los polipéptidos maduros que carecen de todos o de una porción del sitio de fijación de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el terminus-C de modo que a partir de la expresión los polipéptidos son solubles. Polipéptidos de sHuPH20 ejemplares incluyen polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC D NOS: 4-9 47-48. Los polipéptidos

precursores para dichos polipéptidos de sHuPH20 ejemplares incluyen una secuencia de señal. Son ejemplos de precursores aquellos expuestos en las SEC ID NOS: 3 y 40-46, cada uno de los cuales contiene una secuencia de señal de 35 aminoácidos en las posiciones de los aminoácidos 1-35. Los polipéptidos de HuPH20 soluble también incluyen aquellos degradados durante o después de los métodos de producción y de purificación descritos en la presente.

Como se usa en la presente, PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20) se refiere a una forma soluble de PH20 humana que es expresada recombinantemente en células de Ovario de Cobayo (Hámster Chino) (CHO, siglas del inglés Chinese Hamster Ovary). La rHuPH20 soluble es codificada por el ácido nucleico que incluye la secuencia de señal y es expuesta en la SEC ID NO: 49. También se incluyen moléculas de ADN que son variantes alélicas de éstas y otras variantes. El ácido nucleico que codifica a rHuPH20 soluble es expresado en células de CHO, las cuales secretan el polipéptido maduro. Como se produjo en el medio de cultivo hay heterogeneidad en el terminus-C de modo que el producto incluye una mezcla de especies que puede incluir una cualquiera o más de las SEC ID NOS: 4-9 en varias abundancias. También se incluyen las variantes alélicas correspondientes y otras variantes, incluyendo aquellas

34

correspondientes a polipéptidos de PH20 humano precursor expuestas en las SEC ID NOS: 50-51. Otras variantes pueden tener 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEC ID NOS: 4-9 y 47-48 mientras que retienen una actividad hialuronidasa y son solubles.

Como se usa en la presente, actividad, se refiere a una actividad o actividades funcional(es) de un polipéptido o porción de éste asociada con una proteína de extensión total (completa). Las actividades funcionales incluyen, pero no se limitan a, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (habilidad para enlazar o competir con un polipéptido para enlazar a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, habilidad para formar multímeros, y la habilidad para enlazar específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

Como se usa en la presente, actividad hialuronidasa se refiere a la habilidad de la hialuronidasa para fragmentar el ácido hialurónico. Ensayos in vitro para determinar la actividad hialuronidasa de hialuronidasas, como rHuPH20 soluble, son conocidos en el arte y se describen en la presente. Ensayos ejemplares incluyen el ensayo de microturbidez descrito posteriormente (véase por ejemplo, el Ejemplo 3) que mide la fragmentación del ácido hialurónico

por hialuronidasa indirectamente por medio de la detección del precipitado insoluble formado cuando ácido hialurónico sin fragmentar enlaza con albúmina de suero.

Como se usa en la presente, los residuos de α-aminoácidos como se encuentran de manera natural son los residuos de 20 α-aminoácidos encontrados en la naturaleza, los cuales son incorporados en proteínas por medio del reconocimiento específico de la molécula de tARN cargada con su codón de mARN análogo en humanos.

Como se usa en la presente, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de éstos, incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (PNA, siglas del inglés Peptide Nucleic Acids) y mezclas de éstos. Los ácidos nucleicos pueden ser de una sola hebra o de doble hebra. Cuando nos referimos a sondas o cebadores, los cuales son opcionalmente marcadas, como con un marcador detectable, como un marcador fluorescente o radiomarca, se contemplan moléculas de una sola hebra. Dichas moléculas son típicamente de una extensión tal que su objetivo es estadísticamente único o de bajo número de copias (típicamente menos de 5, generalmente menos de 3) para sondear o cebar una biblioteca. Generalmente una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas o cebadores pueden ser de 10, 20, 30, 50,

100 o más ácidos nucleicos de largo.

Como se usa en la presente, un péptido se refiere a un polipéptido que es desde 2 a 40 aminoácidos de extensión.

Como se usa en la presente, los aminoácidos que se encuentran en las varias secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente son identificados de conformidad con sus abreviaciones de una letra o de tres letras conocidas (Tabla 1). Los nucleótidos que se encuentran en varios fragmentos de ácido nucleicos son designados con la designación de tres letras individuales estándar usada rutinariamente en el arte.

Como se encuentra en la presente, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los propósitos de la presente, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos que se encuentran de manera natural, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en donde el carbono alfa tiene una cadena lateral).

Como se usa en la presente, "residuo de aminoácido", se refiere a un aminoácido formado a partir de la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus ligaduras peptídicas. Los residuos de aminoácido descritos en la presente se asume que están en la forma isomérica "L". Los

residuos en la forma isomérica "D", los cuales son designados así, pueden ser sustituidos por cualquier residuo de aminoácido-L mientras que la propiedad funcional deseada sea retenida por el polipéptido. NH_2, se refiere al grupo amino libre presente en el terminus amino de un polipéptido. COOH, se refiere al grupo carboxi libre presente en el terminus carboxi de un polipéptido conservando la nomenclatura de polipéptidos estándar descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y adoptada 37 C.F.R., §§ 1.821-1.822, las abreviaciones para los residuos de aminoácidos se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1- Tabla de Correspondencia

SIMBOLO		
1-Letra	3-Letras	Aminoácido
y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Acido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptofano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Acido aspártico

Tabla 1 (Continuación)

SIMBOLO		
1-Letra	3-Letras	Aminoácido
N	Asn	Asparagina
B	Asn	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

Se hace debe hacer notar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en la presente por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del termuinus-amino al terminus-carboxilo. Además, la frase "residuo de aminoácido" es definida ampliamente para incluir los aminoácidos enlistados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y modificada y aminoácidos inusuales, como los mencionados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, e incorporados a la presente como referencia. Además, se hace notar que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos, a un grupo amino terminal como NH2 o a un grupo carboxilo terminal como COOH.

Como se usa en la presente, "aminoácidos como se encuentran de manera natural", se refiere a los 20 L-aminoácidos que se encuentran en polipéptidos.

Como se usa en la presente, "aminoácidos no naturales", se refiere a un compuesto orgánico que tiene una

estructura similar a un aminoácido natural pero ha sido modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Por consiguiente, los aminoácidos que no se encuentran de manera natural incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos que se encuentran de manera natural e incluyen, pero no se limitan a, los D-isoestereómeros de aminoácidos. Se describen aminoácidos no naturales ejemplares en la presente y son conocidos por los expertos en el arte.

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

Como se usa en la presente, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN más grande que tiene atributos específicos. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica a un polipéptido específico es una porción de una molécula de ADN más larga, como un plásmido o un fragmento de plásmido, el cual cuando se lee desde la dirección 5' a 3', codifica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido específico.

Como se usa en la presente, el término "polinucleótido" significa un polímero de una o de doble hebra de desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos bases leídas desde el extremo 5' a 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden ser aislados desde fuentes naturales, sintetizados in vitro, o preparados desde una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La extensión de una molécula de polinucleótido se da en la presente en términos de nucleótido (abreviado "nt") o pares base (abreviado "pb"). El término nucleótidos es usado para moléculas de una sola o de doble hebra donde lo permita el contexto. Cuando el término es aplicado a moléculas de doble hebra, es usado para denotar extensión total y se comprenderá que es equivalente al término pares base. Los expertos en el arte reconocerán que las dos hebras de un polinucleótido de doble hebra pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos de éstas pueden estar desplazados; así todos los nucleótidos en una molécula de polinucleótido de doble hebra pueden no estar emparejados. Dichos extremos disparejos, en general, no excederán de 20 nucleótidos de extensión.

Como se usa en la presente "similaridad" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la conexión entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o de las secuencias de los ácidos nucleicos del nucleótido.

41

Similarmente peden basarse en el grado de identidad y/o homología de secuencias de residuos y de los residuos contenidos en ellas.

Los expertos en el arte conocen métodos para evaluar el grado de similaridad entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método de evaluar la similaridad de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos son alienadas en una manera que produzca un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "identidad", se refiere a la medida en la cual las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos son invariables. La alineación de secuencias de aminoácidos y en algún grado de secuencias de nucleótidos, también puede tomar en cuenta diferencias conservadoras y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Diferencias conservadoras son aquellas que preservan las propiedades físico-químicas del residuo involucrado. Las alineaciones pueden ser generales (alineación de las secuencias comparadas sobre la extensión entera de las secuencias y que incluye todos los residuos) o local (la alineación de una porción de las secuencias que incluye solamente la región o regiones más similares.

"Identidad", per se tiene un significado reconocido en el arte y puede ser calculada usando técnicas publicadas. (Véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk,

A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. Y Devereaux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991). Aunque existen numerosos métodos para medir la identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por los expertos en la materia (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J. Applied Math. 48: 1073 (1988)).

Como se usa en la presente, "homólogo" (con respecto a secuencias de ácidos nucleicos y/o de aminoácidos) significa aproximadamente mayor que o igual a 25 % de homología de secuencia, típicamente mayor que o igual a 25 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de homología de secuencia; el porcentaje preciso puede ser especificado si es necesario. Para los propósitos de la presente los términos "homología" e "identidad" a menudo, son usados indistintamente, a menos que se indique de otra manera. En general, para determinación del porcentaje de homología o identidad; las secuencias son alineadas de modo que se obtenga el máximo orden de parejas (véase, por ejemplo,

43

Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., Eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereaux, J., Eds., M. Stockton Press, New York, 1991; Carillo y colaboradores (1988) SIAM J. Applied Math. 48: 1073). Por "homología de secuencia", el número de aminoácidos conservados es determinado por medio de programas de algoritmos de alineación estándar, y pueden ser usados con penalidades de espacios de faltantes establecidos por cada proveedor. Moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente homólogas hibridizarían típicamente a severidad moderada o a severidad alta a todo lo largo de la extensión del ácido nucleico de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de los codones en la molécula de ácido nucleico hibridizante.

Ya sea que cualquiera de dos moléculas tenga secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que sean al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % "idénticas u "homólogas", esto puede ser

determinado usando algoritmos de cómputo conocidos, como el programa "FASTA", usando por ejemplo, los parámetros faltantes como en Pearson y colaboradores (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (otros programas incluyen el programa paquete GCG (Devereaux, J., y colaboradores, Nucleics Acids Research 12 (I): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. y colaboradores, J. Molec. Biol. 215: 403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo y colaboradores (1988) SIAM J. Applied Math 48: 1073). Por ejemplo, puede usarse la función BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information para determinar la identidad. Otros programas disponibles pública o comercialmente incluyen el programa DNAStar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa "Gap" del University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) (Madison WI). El por ciento de homología o de identidad de moléculas de proteínas y/o de ácidos nucleicos puede ser determinado, por ejemplo, por comparación de la información de secuencia usando un programa de cómputo GAP (por ejemplo, Needleman y colaboradores (1970) J. Mol. Biol. 48¨443, revisado por Smith y Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482). Resumiendo, el programa GAP define similaridad como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, divididos entre el número

total de símbolos en la más corta de las dos secuencias.. Los parámetros faltantes para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contenga un valor de 1 para identidades y 0 para no-identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gibskov y colaboradores (1986) Nucl. Acids. Res. 14: 6745, como se describió por Schwartz y Dayhoff, Eds. ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pág. 353-358 (1979); (2) una penalidad de 3.0 ara cada espacio y una penalidad adicional de 0.10 para cada símbolo en cada espacio; y (3) ninguna penalidad para espacios terminales.

Por consiguiente, como se usa en la presente, el término "identidad" u "homología, representa una comparación entre un polinucleótido o polipéptido de prueba y uno de referencia. Como se usa en la presente, el término al menos "90 % idéntico a", se refiere a por ciento de identidades desde 90 a 99.99 en relación a la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de referencia. Identidad a un nivel de 90 % o más es indicador del hecho que, suponiendo para propósitos de ejemplificación que sean comparados un polipéptido de prueba y uno de referencia de 100 aminoácidos de extensión. No más de 10 % (es decir, 10 afuera de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de prueba difieren de los del polipéptido de referencia. Pueden hacerse comparaciones similares entre

polinucleótidos de prueba y de referencia. Dichas diferencias pueden ser representadas como mutaciones puntuales aleatoriamente distribuidas sobre la extensión total de un polipéptido o pueden estar aglomerados en una o más localizaciones de extensión variable hasta el máximo permisible, por ejemplo, diferencia de 10/100 aminoácidos (aproximadamente 90 % de identidad). Las diferencias son definidas como sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Al nivel de homologías o identidades superiores a 85 - 90 %, el resultado deberá ser independiente del programa y grupo de parámetros de espacios; dichos altos niveles de identidad pueden ser evaluados fácilmente, a menudo por alineación manual sin confiar en el "software".

Como se usa en la presente, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similaridad y/o identidad) para alinear las posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos. Típicamente, son alienadas dos o más secuencias que están relacionadas en 50 % o más de identidad. Un grupo de secuencias alineadas se refiere a 2 o más secuencias que están alineadas en posiciones correspondientes y pueden incluir secuencias que se alinean derivadas de ARNs, y otra cADNs, alienadas con secuencia de ADN genómico.

47

Como se usa en la presente, "cebador", se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como un punto de iniciación de síntesis de ADN dirigida hacia el modelo bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, en la presencia de cuatro trifosfatos de nucleósidos diferentes y un agente de polimerización, como ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa en sentido contrario) en un regulador apropiado y a una temperatura adecuada. Se apreciará que ciertas moléculas de ácidos nucleicos pueden servir como una "sonda" y como un "cebador". Un cebador, no obstante, tiene un grupo hidroxilo en 3' por extensión. Un cebador puede ser usado en una variedad de métodos, incluyendo, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcriptasa en sentido contrario (RT)-PCR, ARN PCR, LCR, PCR multiplex, PCR con enclave, PCR de captura, PCR de expresión, 3' y 5'RACE, PCR in situ, PCR- mediada por ligadura y otros protocolos de amplificación.

Como se usa en la presente, "par cebador" se refiere a un grupo de cebadores que incluyen un cebador 5' (de 5' a 3') que hibridiza con el extremo 5' de una secuencia a ser amplificada (por ejemplo, por PCR y un cebador 3' (de 3' a 5') que hibridiza con el complemento del extremo 3' de la secuencia a ser amplificada.

Como se usa en la presente, "específicamente

hibridiza", se refiere a fortalecimiento, por emparejamiento con la base complementaria, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) a una molécula de ácido nucleico objetivo. Los expertos en la materia están familiarizados con parámetros in vitro e in vivo que afectan la hibridización específica, como longitud y composición de la molécula particular. Parámetros particularmente relevantes para hibridización *in vitro* incluyen adicionalmente temperatura de lavado y de fortalecimiento, composición reguladora y concentración de sales. Condiciones de lavado ejemplares para remover moléculas de ácido nucleico enlazadas no específicamente a alta severidad son =.1 x SSPE, 0.1 % de SDS, 65 °C, y a severidad media son 0.2 SSPE, 0.1 % de SDS, 50 °C. Condiciones de severidad equivalente son conocidas en el arte. El experto en la materia puede ajustar fácilmente estos parámetros para lograr hibridización específica de una molécula de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico objetivo apropiada para una aplicación particular. Complementarias cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridizar, típicamente con menos de 25 %, 15 % o 5 % de desigualdades entre nucleótidos opuestos. Si es necesario, el porcentaje de complementaridad será especificado. Típicamente, las dos moléculas son

seleccionadas de modo que hibridizarán bajo condiciones de alta severidad.

Como se usa en la presente, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar de modo que la propiedad de interés es suficientemente sin cambio de modo que el producto sustancialmente idéntico puede ser usado en lugar del producto.

Como se usa en la presente, también se comprende que los términos "sustancialmente idéntico" o "similar" varian con el contexto como comprenderán los expertos en el arte relevante.

Como se usa en la presente, una variante alélica o variaciones alélicas, referencias a cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Variación alélica surge naturalmente mediante una mutación, y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico en poblaciones. La mutación genética, puede ser silenciosa (sin cambio en el polipéptido codificado) o puede codificar polipéptidos que tengan que tengan secuencia de aminoácido alterada. El término "variante alélica" también es usado en la presente para denotar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. Típicamente, la forma de referencia del gen codifica una forma salvaje y/o forma predominante de un polipéptido a partir de una población o

elemento de referencia individual de una especie. Típicamente, variantes alélicas, las cuales incluyen variantes entre y mezclado con especies que tienen típicamente al menos 80 %, 90 % o más identidad de aminoácidos con una forma predominante y/o de tipo salvaje de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y de si la comparación es inter-especies o intra-especies. Generalmente, variantes alélicas intra-especies tienen al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad o mayor con una forma predominante o de tipo salvaje, incluyendo 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad con una forma predominante o de tipo salvaje de un polipéptido. La referencia a una variante alélica en la presente generalmente se refiere a variaciones en proteínas entre elementos de la misma especie.

Como se usa en la presente, "alelo", el cual es usado indistintamente en la presente con "variante alélica", se refiere a formas alternativas de un gen o porciones de éste. Los alelos ocupan el mismo locus o posición sobre cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homozigótico para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterozigótico para el gen. Alelos de un gen específico pueden diferir entre

sí en un nucleótido individual o en varios nucleótidos, y pueden incluir sustituciones, eliminaciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

Como se usa en la presente, especies variantes, se refiere a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, como ratón y humano.

Como se usa en la presente, una variante de empalme, se refiere a una variante producida por medio de diferente procesamiento de un trascripto primario de ADN genómico que da como resultado más de un tipo de mARN.

Como se usa en la presente, modificación, es una referencia a modificación de una secuencia de aminoácidos o de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácidos nucleicos e incluye eliminaciones, inserciones, y reemplazos de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Los métodos para modificar un polipéptido son rutinarios para los expertos en el arte, como usando metodologías de ADN recombinante.

Como se usa en la presente, el término promotor significa una porción de un gen que contiene secuencias de ADN que se proporciona para el enlace de ARN polimerasa e iniciación de trascripción. Las secuencias promotoras son

comúnmente, pero no siempre, encontradas en la región no codificadora 5' de genes.

Como se usa en la presente, proteína o polipéptido purificado o aislado o porción de éstos biológicamente activa está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido desde el cual se ha derivado la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando es sintetizada químicamente. Se puede determinar que las preparaciones son sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables determinado por medio de los métodos estándares de análisis, tales como cromatografía en capa fina (TLC, siglas del inglés Thin Layer Chromatography), electroforesis sobre el y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, siglas del inglés High Performance Liquid Chromatography), usados por los expertos en el arte para evaluar dicha pureza, o suficientemente pura de modo que la purificación adicional no alteraría de manera detectable las propiedades físicas y químicas, como las actividades biológicas y enzimáticas, de la sustancia. Los métodos de purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente puros químicamente son conocidos pro los expertos en el arte. Un compuesto sustancialmente puro químicamente, no obstante, puede ser una mezcla de

estereoisómeros. En dichos casos, la purificación adicional debe incrementar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las cuales la proteína es separada de los componentes celulares de las células a partir de las cuales es aislada o producida recombinantemente. En una modalidad, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de proteínas no enzimáticas) (también mencionadas en la presente como una proteína contaminante), generalmente menos de aproximadamente 20 % de proteínas no enzimáticas o 10 % de proteínas no enzimáticas o menos de aproximadamente 5 % de proteínas no enzimáticas. Cuando la proteína enzimática es producida recombinantemente, está también sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente o en 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de proteína enzimática.

Como se usa en la presente, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas enzimáticas en las cuales la proteína es separada de precursores químicos u otros productos químicos que están

involucrados en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tengan menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) 20 %, 10 %, 5 % o menos de precursores químicos o componentes o productos químicos no enzimáticos.

Como se usa en la presente, "sintético", con referencia a, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico sintético o un gen sintético o un péptido sintético, se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula de péptido que es producida por medio de métodos recombinantes y/o por medio de métodos de síntesis química.

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

Como se usa en la presente, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que son usados para introducir un ácido nucleico heterólogo en células ya sea para expresión o bien para replicación de éste. Los vectores típicamente permanecen episomales, pero pueden ser diseñados para efectuar la integración de un gen o de una porción de éste en un cromosoma del genoma. También están contemplados vectores que son cromosomas artificiales, como cromosomas artificiales de levaduras y cromosomas artificiales de mamíferos. La

selección y el uso de dichos vehículos son bien conocidos por el experto en el arte.

Como se usa en la presente, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que están operativamente ligados con secuencias reguladoras, 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 opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un mejorador, una señal de poliadenilación, y los similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de ADN plásmido o viral, o pueden contener elementos de ambos. Por consiguiente, un vector de expresión se refiere a una construcción de ARN o ADN recombinante, como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, desde la introducción en una célula huésped apropiada da como resultado la expresión de un ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en el arte e incluyen aquellos que son replicables en células eucarióticas y/o células procarióticas y aquellos que permanecen episomales o aquellos que se integran en el genoma de la célula huésped.

Como se usa en la presente, vector también incluye

"vectores de virus" o "vectores virales". Vectores virales son virus diseñados que están ligados operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzadores) los genes exógenos al interior de las células.

Como se usa en la presente, operable u operativamente ligado cuando se refiere a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan en concierto para sus propósitos previstos, por ejemplo, la transcripción inicia en el promotor y procede a través del segmento que codifica al terminador.

Como se usa en la presente, el término evaluar está previsto para incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteasa, o de un dominio de ésta, presente en la muestra, y también de obtener un índice, proporción, porcentaje, valor visual u otro indicador del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y la especie química actualmente detectada no necesita ser, por supuesto, producto de la proteólisis misma, sino que puede por ejemplo, ser un derivado de ésta o de alguna sustancia adicional. Por ejemplo, la detección de un producto de fragmentación de una proteína de complemento, como por SDS-PAGE y tinción proteínica con azul de Coomasie.

Como se usa en la presente, actividad biológica se

refiere a las actividades in vivo de un compuesto o a respuestas fisiológicas que resultan después de la administración in vivo de un compuesto, composición u otra mezcla. Actividad biológica, por consiguiente, abarca efectos terapéuticos y actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden ser observadas en sistemas in vitro diseñados para probar o usar dichas actividades. Por consiguiente, para propósitos de la presente un ensayo biológico de una proteasa es su actividad catalítica en la cual es hidrolizado un polipéptido.

Como se usa en la presente equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican a la misma secuencia de aminoácidos o a proteínas equivalentes. Cuando equivalente es usado haciendo referencia a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con solamente 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 el mismo grado (por ejemplo, dos péptidos pueden exhibir diferentes velocidades del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades

son usualmente de manera sustancial las mismas.

Como se usa en la presente, "modular" y "modulación" o "alterar", se refieren a un cambio de una actividad de una molécula, como una proteína. Actividades ejemplares incluyen, pero no se limitan a, actividades biológicas, como una señal de transducción. Modulación puede incluir un incremento en la actividad (es decir, sobre-regulación o actividad agonista) una disminución en la actividad (es decir sub-regulación o inhibición) o cualquier otra alteración en una actividad (como un cambio en periodicidad, frecuencia, duración, cinética u otros parámetros). Modulación puede ser contexto dependiente, y típicamente modulación, se compara a un estado determinado, por ejemplo, proteína de tipo salvaje, la proteína en un estado constitutivo, o la proteína como se expresa en una condición o tipo celular determinado.

Como se usa en la presente, una composición se refiere a cualquier mezcla. Si puede ser una solución, suspensión, líquido, polvo, pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de éstas.

Como se usa en la presente, una combinación se refiere a cualquier asociación entre o mezcla de dos o más artículos. La combinación puede ser de dos o más artículos separados, como dos composiciones o dos colecciones, puede

ser una mezcla de éstos, como una mezcla individual de los dos o más artículos, o cualquier variación de éstos. Los elementos de una combinación están generalmente, de manera funcional asociados o relacionados.

Como se usa en la presente, un equipo es una combinación empacada que opcionalmente incluye otros elementos, como reactivos e instrucciones adicionales para uso de la combinación o elementos de ésta.

Como se usa en la presente, "enfermedad o trastorno", se refiere a una condición patológica en un organismo resultante de causa o condición que incluye, pero no se limita a, infecciones, condiciones adquiridas, condiciones genéticas, y caracterizada por síntomas identificables. Enfermedades y trastornos de interés en la presente son aquellas que son tratables por medio de inmunoglobulina.

Como se usa en la presente, "tratar" a un sujeto con una enfermedad o condición significa que los síntomas del sujeto son aliviados total o parcialmente, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por consiguiente, tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. Profilaxis se refiere a prevención de una enfermedad potencial y/o prevención del empeoramiento de los síntomas o progreso de una enfermedad. Tratamiento también abarca cualquier uso

farmacéutico de una preparación de inmunoglobulina y composiciones proporcionadas en la presente.

Como se usa en la presente, un agente efectivo farmacéuticamente, incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, incluyendo, pero no limitándose a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes dispersantes, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo fármacos de moléculas pequeñas y proteínas terapéuticas.

Como se usa en la presente, tratamiento significa cualquier manera en la cual los síntomas de una condición, trastorno o enfermedad u otra indicación, son mejorados o de otra manera alterados benéficamente.

Como se usa en la presente "efecto terapéutico" significa un efecto resultante del tratamiento de un sujeto que altera, típicamente beneficia o mejora los síntomas de una enfermedad o condición o que cura una enfermedad o condición. Una cantidad efectiva terapéuticamente se refiere a la cantidad de una composición, molécula o compuesto que da como resultado un efecto terapéutico después de administración a un sujeto.

Como se usa en la presente, el término "sujeto", se refiere a un animal, incluyendo un mamífero, como un ser humano.

Como se usa en la presente, un paciente se refiere a un sujeto humano.

Como se usa en la presente, mejoramiento de los síntomas de una enfermedad o trastorno particular por medio de un tratamiento, como por administración de una composición farmacéutica u otro agente terapéutico, se refiere a cualquier aminoración ya sea permanente o temporal, que dure o transitorio, de los síntomas que pueden ser atribuidos a o asociados con la administración de la composición o agente terapéutico.

Como se usa en la presente, prevención o profilaxis, se refiere a métodos en los cuales el riesgo de desarrollar la enfermedad o condición se reduce.

Como se usa en la presente, "una cantidad efectiva terapéuticamente" o "una dosis efectiva terapéuticamente", se refiere a la cantidad de un agente, compuesto, material, o composición que contenga un compuesto que sea al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Por consiguiente, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

Como se usa en la presente, forma de dosis unitaria, se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas para sujetos humanos y animales y empacados

individualmente como es sabido en el arte.

Como se usa en la presente, una formulación en dosificación individual se refiere a una formulación para administración directa.

Como se usa en la presente, un "artículo de fabricación" es un producto que es elaborado y comercializado. Como se usa en el transcurso de esta solicitud, el término está previsto para abarcar composiciones de IG y hialuronidasa contenidas en artículos de empaque.

Como se usa en la presente, fluido se refiere a cualquier composición que pueda fluir. Por consiguiente fluidos abarca composiciones que están en la forma de semi-sólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones.

Como se usa en la presente "equipo" se refiere a una combinación de composiciones proporcionadas en la presente y otro artículo para un propósito que incluye, pero no se limita a, activación, administración, diagnóstico, y evaluación de una propiedad o actividad biológica. Los equipos opcionalmente incluyen instrucciones para uso.

Como se usa en la presente, un extracto o lisado celular, se refiere a una preparación o fracción que es elaborada a partir de una célula lisada o disruptada.

Como se usa en la presente, animal incluye cualquier animal, tal como, pero no se limita a primates, incluyendo humanos, gorilas y monos; roedores, como ratones y ratas; aves, como pollos; rumiantes, como cabras, vacas, ciervos, ovejas; ovinos, como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen humanos como el animal contemplado. Las enzimas proporcionadas en la presente son de cualquier fuente, animal, vegetal, procarióticas y fúngicas. La mayoría de las enzimas son de origen animal, incluyendo de origen mamífero.

Como se usa en la presente, un control, se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de prueba, excepto que no está tratada con un parámetro de prueba, o , si es una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no afectado con la condición de interés. Un control, también puede ser un control interno.

Como se usa en la presente, las formas singulares "un, una" (antes de consonante) y "un, una" (antes de vocal) y "el, la, los, las" incluyen referentes del plural, a menos que el contexto dicte de otra manera. Por consiguiente, por ejemplo, la referencia a un compuesto que comprende "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

Como se usa en la presente, intervalos y cantidades pueden ser expresados como "aproximadamente" un valor o un intervalo particular: aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por consiguiente "aproximadamente 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

Como se usa en la presente "opcional" u "opcionalmente", significa que el evento o circunstancia descritos subsecuentemente ocurre o no, y que la descripción incluye casos donde dicho evento o circunstancia tiene lugar y casos donde no. Por ejemplo, un grupo sustituido opcionalmente significa que el grupo es sustituido o no sustituido.

Como se usa en la presente, las abreviaciones para cualquiera de los grupos protectores, aminoácidos y otros compuestos, son, a menos que se indique de otra manera, de conformidad con su uso común, abreviaciones reconocidas, o la IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (véase, (1972) Biochem. 11: 1726).

B. ADMINISTRACION SUBCUTANEA DE INMUNOGLOBULINA (IG)

Se proporcionan en la presente métodos y usos de tratar enfermedades y condiciones tratables con IG por administración subcutánea de inmunoglobulina (IG) en combinación con una hialuronidasa soluble. Por consiguiente,

también se proporcionan combinaciones de IG y una hialuronidasa soluble. En virtud de la habilidad de la hialuronidasa para desintegrar el ácido hialurónico en la matriz extracelular, la hialuronidasa facilita la infusión subcutánea de agentes terapéuticos. La inmunoglobulina es un agente terapéutico que es primeramente dado por administración intravenosa para tratar individuos con deficiencias inmunes, mencionada como terapia IVIG. La biodisponibilidad de IG en la presencia de hialuronidasa es mayor que 90 % de la biodisponibilidad de IG después del tratamiento IVIG. Por consiguiente, en los métodos y usos proporcionados en la presente, la terapia en combinación de hialuronidasa e IG permite la administración subcutánea de inmunoglobulina a dosificaciones y frecuencias que son similares al tratamiento IVIG. Así, por ejemplo, en los métodos y usos proporcionados en la presente, IG, cuando se administra subcutáneamente en la presencia de hialuronidasa soluble, puede ser administrada una vez mensualmente a dosis de IVIG eficaces para la indicación particular. Adicionalmente, porque la hialuronidasa actúa para abrir canales de flujo en la piel puede acelerar la velocidad de infusión. Por consiguiente, métodos de administrar subcutáneamente IG co-formulada y/o co-administrada con hialuronidasa incrementan las velocidades de infusión, y

disminuye así el tiempo de liberación de la terapia con IG.

La formación de anticuerpos defectuosos es la anormalidad más común en la mayoría de las enfermedades por inmunodeficiencia primaria (PID, siglas del inglés Primary Inmunodeficiency Diseases); se refleja más a menudo por una disminución en las inmunoglobulinas del suero, lo cual a su vez conduce a susceptibilidad creciente a infecciones bacterianas, especialmente del tracto sinopulmonar. Los niveles disminuidos de inmunoglobulina son encontrados en individuos que tienen defectos de anticuerpos como agamaglobulinemia congénita o relacionada con el cromosoma X, eliminaciones de la cadena pesada de inmunoglobulina, deficiencia de la subclase de inmunoglobulina G selectiva (IgG), inmunodeficiencia variable común, o síndrome de hiperinmunoglobulina M relacionada con rayos X. Los niveles de inmunoglobulina abatidos también son encontrados en individuos que tienen inmunodeficiencias combinadas debido a defectos en las células B y T, tal, como, pero no se limita a, inmunodeficiencia combinada severa o Síndrome de Wiskott Aldrich (IUIS Scientific Committee, 1999).

Individuos con estas deficiencias requieren terapia de reemplazo con productos de inmunoglobulina para prevenir o reducir la severidad de infecciones. Inicialmente, la terapia de reemplazo de inmunoglobulina fue dada por la ruta

intramuscular, pero a principios de 1981 la abrumadora mayoría de pacientes ha sido tratada por la ruta intravenosa (IV). Corrientemente, la mayoría de los productos de inmunoglobulina en los Estados Unidos son para administración IV. Sin embargo, las preparaciones de inmunoglobulina han sido desarrolladas más recientemente para administración subcutánea (Gardulf y colaboradores (2006) Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 6: 434-42; Gardulf y colaboradores (2006) J. Clin. Immunol., 26: 265-73). Al menos un producto, Vivaglobin®, es aprobado para administración subcutánea.

Todas las preparaciones de inmunoglobulina usadas actualmente son formuladas al 16 %, en comparación con preparaciones IVIG formuladas al 5 a 12 %. Concentración más alta en relación a preparaciones IV permiten volúmenes de infusión más pequeños; dichas preparaciones no pueden ser infusionadas intravenosamente. Dichos métodos subcutáneos de terapia de reemplazo de inmunoglobulina se consideran efectivos, seguros y también muy apreciados por pacientes para tener un bajo riesgo de reacciones adversas generalizadas y conduce a mínimos más altos en concentraciones de IgG en suero en comparación con infusiones IV mensuales (Gardulf y colaboradores (1995)) J. Adv. Nurs., 21: 917-27; Gardulf y colaboradores (1993) Clin. Exp. Immunol., 92: 200-4; Gardulf y colaboradores (1991) Lancet,

338: 162-6).

La biodisponibilidad de inmunoglobulina administrada subcutáneamente generalmente es menor que la infusionada intravenosamente. La inmunoglobulina está disponible inmediatamente en la sangre, y se equilibra lentamente en el compartimento extra-vascular durante 3 a 5 días (Schiff y colaboradores (1986) J. Clin. Immunol., 6: 256-64). La inmunoglobulina administrada subcutáneamente es absorbida lentamente desde el espacio subcutáneo en la sangre y al mismo tiempo se equilibra con el compartimento extra-vascular; no hay picos IV altos. La biodisponibilidad no ha sido estudiada extensivamente, pero en un ensayo reciente de la preparación de ZLB-Behring (es decir Vibaglobin®), se determinó por medición del área bajo la curva (AUC) que solamente 67 % de la inmunoglobulina fue absorbida y por consiguiente, la dosis recomendada fue de 137 % de la dosis IV (Ochs y colaboradores (2006) J. Clin. Immunol., 26: 265-73). A pesar de las dificultades técnicas de comparar el AUC por dos rutas y frecuencias de administración diferentes, estudios de inmunoglobulina administrada intradérmicamente en conejos sugieren que has biodisponibilidad disminuida a través de la ruta subcutánea. Esto puede ser debido al modo de absorción de moléculas de proteína grandes, las cuales no pueden difundirse fácilmente a través de las paredes

capilares y deben ser absorbidas vía los vasos linfáticos (Supersaxo y colaboradores (1990) Pharm. Res., 7: 167-9).

Además de problemas con la biodisponibilidad asociados con la administración subcutánea de IG, la desventaja primaria de la administración SC es que solamente pequeños volúmenes pueden ser infusionados en cada sitio, necesitándose el uso de sitios múltiples sobre una base semanal o bisemanal (por otra semana). Generalmente, usando una solución al 16 %, aproximadamente 20 mL pueden ser infusionados por sitio; y paciente adulto que recibe 400 mg/kg de peso corporal (PC)) requeriría así al menos 3 sitios por semana o 12 sitios por mes. Aunque a la administración semanal o bisemanal se ha añadido la ventaja de mantener mejor los niveles mínimos que por infusiones IV mensualmente, los requerimientos de inserciones múltiples de agujas ha sido desanimante para muchos pacientes.

El espacio SC está formado por una retícula de colágeno llena con una sustancia similar a un gel, ácido hialurónico. El ácido hialurónico es reemplazado con una vida media de aproximadamente 5 horas, y es ampliamente responsable por la resistencia a fluir del fluido a través de los tejidos. La hialuronidasa temporalmente digiere el ácido hialurónico, facilitando así infusiones en el espacio subcutáneo. El ácido hialurónico es restaurado en 24 horas,

no dejando cambios observables. Por consiguiente, debido a la habilidad de la hialuronidasa para abrir canales en el espacio intersticial a través de la degradación de glicosaminoglicanos, la administración de una hialuronidasa soluble permite la difusión de moléculas, mejorando así la biodisponibilidad, las características farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de dichas moléculas co-formuladas y co-administradas.

En algunos ejemplos, la biodisponibilidad de IG co-administrada subcutáneamente con hialuronidasa es 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de la biodisponibilidad de IVIG. Típicamente, la biodisponibilidad es mayor que 90 %. Adicionalmente, la co-administración con una hialuronidasa soluble permite la infusión de grandes volúmenes en un solo sitio subcutáneo. Por ejemplo, volúmenes de hasta 600 mL o mayores de IG pueden ser administrados en un solo sitio en una sola sesión, por ejemplo 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, o más pueden ser administrados en un solo sitio en una administración individual. Así, una preparación de IG formulada en o entre 5 - 12 % puede ser co-administrada subcutáneamente con una hialuronidasa soluble a dosificaciones equivalentes para dosis IVIG una vez al mes, por ejemplo, a o aproximadamente 100 mg/kg, 200 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg, 500 mg/kg, 600

71

mg/kg o más. Las dosificaciones pueden ser administradas como una dosis única o pueden ser divididas en dosis múltiples dadas diaria o semanalmente, como una vez a la semana, o cada dos, tres o cuatro semanas o combinaciones de éstas. Por consiguiente, al administrar IG subcutáneamente en la presencia de una hialuronidasa soluble, una o todas las consideraciones y problemas asociados con la administración subcutánea de IG son resueltos. Así, en virtud de las propiedades de dispersión de hialuronidasa, administrar subcutáneamente IG en la presencia de una hialuronidasa soluble permite la administración de dosis IVIG a frecuencias de IVIG una vez 1 mes, mientras que se mantiene la biodisponibilidad de IVIG.

Las siguientes secciones describen inunoglobulinas ejemplares y hialuronidasas solubles en las combinaciones de la presente, métodos de elaborarlas, y usarlas para tratar enfermedades y condiciones tratables con IG.

C. Inmunoglobulina

Se proporcionan en la presente inmunoglobulinas (IG, también mencionadas como gama globulinas o IgG) que pueden ser usadas para administración subcutánea en combinación con una hialuronidasa soluble. IG actúa para fortalecer el sistema inmune por modulación de la actividad de complemento, suprimir la producción de auto-anticuerpos,

saturar o bloquear a los receptores de Fc sobre macrófagos y linfocitos B, y suprimir la producción de mediadores inflamatorios como citoquinas, quimioquinas y metaloproteinasas.

IG es una fracción proteínica encontrada en el plasma de animales superiores y contiene un gran número de anticuerpos que tienen especificidades variables. Generalmente, IG contiene inmunoglobulinas de suero que pueden ser cualquier idiotipo, como IgG y varias subclases, IgA, IgM, IgD, IgE. Las varias inmunoglobulinas o subclases pueden estar presentes a varias concentraciones y especificidades, las cuales pueden diferir entre preparaciones de inmunoglobulinas dependiendo, por ejemplo, sobre la exposición de los donadores de plasma a antígenos (por ejemplo, por medio de vacunaciones). A menudo, las inmunoglobulinas están presentes en cantidades normalmente encontradas en el suero (véase la Tabla 2), aunque pueden emplearse etapas de purificación para alterar las proporciones de clases o subclases de inmunoglobulinas particulares. Típicamente, preparaciones de IG contienen 90 % o más IgG, como 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de IgG. Las inmunoglobulinas pueden ser policlonales o monoclonales. Típicamente, las preparaciones incluyen un alto porcentaje de IgG monomérica y un bajo

contenido de IgA.

TABLA 2: Inmunoglobulina de Suero

Clase Ig	Nivel en suero, mg/ml (%)	Función
IgG	1200(77)	Ig importante en humanos
IgA	200(13)	Protege la mucosa
IgM	150(9)	Ig importante para respuestas inmune primarias
IgD	2(<1)	Regula las células B
IgE	<1(trazas)	Ig importante en respuestas alérgicas

Las inmunoglobulinas pueden ser aisladas a partir de sangre animal o humana o producida por tros medios, por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante o tecnología del hibridoma. Por ejemplo, las inmunoglobulinas pueden ser obtenidas a partir de tejidos, cultivos de hibridoma de linfocitos, suero o plasma de sangre, o cultivos celulares recombinantes usando cualquier procedimiento de fraccionamiento adecuado, por ejemplo, precipitaciones en medio alcohólico o separaciones por intercambio iónico. En general, IG es preparada a partir de plasma sanguíneo por fraccionamiento en medio alcohólico, como se empleó originalmente por Cohn y lo modificó por Oncley (el método de Cohn-Oncley, véase, por ejemplo, Cohn y colaboradores (1946) J. Am. Chem. Soc. 68: 459-475; Oncley y colaboradores (1949)

J. Am. Chem. Soc., 71:541-550). El uso de alcohol en la purificación puede inactivar virus potencialmente contaminantes. El método de Cohn - Oncley puede dar como resultado proteínas aglomeradas y desnaturalizadas, las cuales pueden dar como resultado formas de alto peso molecular que pueden actuar como complejos antígeno-anticuerpo que tengan la capacidad para fijar libremente el complemento.

Para prevenir dichos efectos indeseables, los métodos de Cohn-Oncley modificados han sido desarrollados para la preparación y purificación de IG. Varios de dichos procedimientos son conocidos y pueden ser adaptados y modificados para uso de las preparaciones de IG de la presente. Está en la experiencia del arte preparar preparaciones de IG en vista de los métodos detallados conocidos y disponibles en el arte. Típicamente, IG es fabricada usando fraccionamiento primario de etanol en frío y un fraccionamiento secundario que puede incluir cualquiera de una o más modificaciones químicas, incubación a pH de 4.0 con o sin pepsina, precipitación con PEG, cromatografía por intercambio iónico, fraccionamiento enzimático, tratamiento con detergente como solvente y diafiltración y ultrafiltración.

Por ejemplo, la separación de aglomerados de IG por

medio de técnicas convencionales como ultra-centrifugación o cromatografía por exclusión, hace posible obtener un producto que tenga una actividad anti-complementaria baja. Otros métodos de preparación de IG incluyen, pero no se limitan a, un proceso para fraccionar plasma humano por medio de polímeros de etilenglicol (Polson y colaboradores (1964) Biochim. Biophys. Acta, 82: 463-475); incorporación de un polietilenglicol (PEG) como un agente de purificación iniciando a partir de un material separado desde el fraccionamiento de Cohn (fracción II o II + III, véase, por ejemplo, Las Patentes U.S. Nos. 4,093,606 y 4,165,370); y otros métodos similares de procesos de purificación con polietilenglicol (EP 0246579). Además, se han descrito procesos para obtener IG que exhiben baja actividad anticomplemento por tratamiento con enzimas como pepsina, plasmina, tripsina inmovilizada, tratamiento a un pH ácido moderado, tratamiento con propiolactona-B, métodos de fraccionamiento que usan polietilenglicol como un agente de precipitación, y otras técnicas descritas en las Patentes U.S. Nos. 4,093, 4,126,605, 3,966,906, y 4,124,576. Otros procesos están basados en modificar química y parcialmente las moléculas de IG tratándolas con agentes reductores, alcoholización, alquilación y sulfonación (véase por ejemplo, la Patente U.S. 6,875,848). La cromatografía por intercambio

iónico puede ser usada para eliminar contaminantes indeseables de los materiales iniciales usados para obtener las preparaciones de IG (véase por ejemplo, la Patente U.S. No. 3,869,436, EP 91300790 y WO 94/29334). EP0440483 describe una combinación de técnicas útiles para facilitar la preparación intravenosa de del producto basado en cromatografía por intercambio iónico y diafiltración a un pH de ácido débil. También se describen en el arte otros métodos y son conocidos por el experto en el arte (véase por ejemplo, la Patente U.S. 5,177,194 y 6,875,848).

Las preparaciones de IG deberán ser tratadas para remover la carga viral. Hay dos métodos para disminuir la carga viral: inactivación viral y separación o remoción viral. Ejemplos de métodos de inactivación viral incluyen, pero no se limitan a, fraccionamiento en frío con etanol, calentamiento (pasteurización), medio ácido y detergente/solvente (bajo pH). Por ejemplo los procesos con solvente/detergente han demostrado tener acción virucida contra VSV (virus de la estomatitis vesicular), virus de Sindbis, VIH, VHB (virus de la hepatitis B) y VHC (virus de la hepatitis C). Ejemplos de remoción y separación viral incluyen, pero no se limitan a, fraccionamiento en frío con etanol, separación de fase o precipitación con polietilenglicol, cromatografía por afinidad, cromatografía

por exclusión sobre gel o por intercambio iónico, y filtración.

La formulación purificada final también debe de ser preparada para evitar aglomeración excesiva y para estabilizar la proteína. La aglomeración de la preparación de IG puede ser minimizada preparando preparaciones liofilizadas para estabilidad mejorada en almacenamiento, para reconstitución con un diluyente antes de uso. Otra manera de incrementar la estabilidad de preparaciones de IG que es bien conocida en el arte es la adición de excipientes estabilizantes de proteínas a la preparación de IG. Los excipientes conocidos incluyen, pero no se limitan a, azúcares, polioles, aminoácidos, aminas, sales, polímeros y tensoactivos. Por ejemplo, la Patente U.S. 4,499,073 describe la estabilización por medio de la selección de pH y de la fuerza iónica; La Patente JP 54020124, describe la adición de un aminoácido a una preparación intramuscular para volver su almacenamiento estable y seguro; Las Patentes JP 57031623 y JP 57128635 describen el uso de arginina y/o lisina con NaCl en preparaciones al 5 a 10 % de IG para lograr estabilidad a largo plazo en una preparación intramuscular; JP 4346934 describe el uso de baja conductividad (menos de mmho), pH de 5.3 a 5.7 y opcionalmente uno o más estabilizantes incluyendo PEG, albúmina de suero humano y manitol; U. S. 4,439,421

expone la adición de una macromolécula hidrofílica, un poliol y otra proteína para estabilizar contra la generación anti-complemento; U. S. 5,945,098 describe la estabilización si soluciones isotónicas por la adición de aminoácidos glicina 0.1 a 0.3 M) y detergentes no-iónicos (polisorbato y PEG); U.S. 4,186,192 describe varios aditivos que incluyen aminoácidos; WO 2005/049078 describe la estabilización con maltosa y adicionalmente glicina a 0.1 M; U.S. 4,362,661 describe el uso de aminoácidos básicos o neutros para impartir estabilidad sobre preparaciones al 5 % de IG. También pueden prepararse formulaciones líquidas estables, que usan carbohidratos en un medio acuoso que tenga una fuerza iónica muy baja y un pH de 4.25 (patente U.S. No. 4,396,608) o un pH de ácido débil de 5-6 (EP 0278422).

También puede controlarse la formación de dímeros de preparaciones de IG. Por ejemplo, la Patente U.S. No. 5,871,736 describe preparaciones de IG, particularmente preparaciones líquidas, que contienen uno o más estabilizantes anfifílicos a fin de estabilizar contra la formación de dímeros. Los estabilizantes anfifílicos incluyen ácido nicotínico y sus derivados, en particular nicotinamida, y principalmente conjuntamente con lo anterior, aminoácidos que tengas cadenas laterales lipofílicas sin carga, por ejemplo, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina,

prolina y valina.

Las preparaciones pueden ser preparadas por medio de métodos conocidos en el arte, como se describe en la presente. No obstante, generalmente, el pH de la preparación final es ajustado a un pH relativamente alto pero ácido, es decir en el intervalo de aproximadamente un pH de 4.2 a 5.4, como un pH en el intervalo de 4.6 a 5.1. Se encontró que este intervalo de pH es particularmente útil para mejorar el almacenamiento de preparaciones de IG.

Generalmente, preparaciones de IG finales tienen una concentración de proteína de aproximadamente 5 a 25 % en peso/volumen. Generalmente de 6 a 15 % en peso/volumen, 8 a 12 en peso/volumen, y típicamente 10 % en peso/volumen. La concentración final de proteínas dependerá de varios factores, como la ruta de administración, el paciente a ser tratado, y el tipo de condición a ser tratada.

En la presente se contempló que cualquier preparación de IG usada para administración IV puede ser usada en los métodos proporcionados en la presente en combinación con una hialuronidasa soluble para administración subcutánea. La preparación incluye formulaciones líquidas y liofilizadas. La inmunoglobulina (IVIG) está comercialmente disponible como Carimune® NF, Flebogamma® 5%, Gammagard® Liquid, Gammagard® S/D, Gamunex®, Iveegam® EN, Octagam® y

Polygam® S/D. Típicamente, dichas preparaciones usan todas un método de fraccionamiento en frío en medio alcohólico, pero usan diferentes métodos para aislar y purificar la inmunoglobulina y diferentes métodos para reducir la contaminación potencial con virus. Adicionalmente, otras preparaciones actualmente formuladas para administración intramuscular o subcutánea pueden ser usadas en las combinaciones y métodos proporcionados en la presente.

Ejemplar de una preparación de Ig es Inmuno Globulina Intravenosa (Humana), al 10 % (IVIG, 10 % comercializada como Gammagard® líquido, Baxter Healthcare Corporation), el cual es una preparación de IgG no modificada líquida con una distribución de subclases de IgG similar a la de plasma normal. La preparación contiene el fragmento cristalizable intacto (Fc) y regiones Fab. Las preparaciones contienen 100 mg/mL de proteínas, con al menos 98 % de IgG; IgA está presente a una concentración de 37 µg/mL IgM está presente solamente en cantidades en trazas. Tiene una osmolalidad que es similar a la osmolalidad fisiológica y no contiene azúcares, sodio o conservadores añadidos. Está formulada con glicina para estabilización a un pH de 4.6 a 5.1. El proceso de fabricación emplea un procedimiento de fraccionamiento en frío en medio alcohólico de Cohn-Oncley modificado y purificación adicional por un proceso continuo

mediante el uso de cromatografía por intercambio catiónico débil y cromatografía por intercambio aniónico débil. El proceso de fabricación también incluye 3 etapas de remoción o de inactivación viral independientes; tratamiento con solvente/detergente (S/D), nanofiltración e incubación a un pH bajo y temperatura elevada.

D. Hialuronidasa

Se proporcionan en la presente combinaciones que contienen inmunoglobulina y una hialuronidasa soluble, y métodos de usar dichas combinaciones para administración subcutánea para el tratamiento de enfermedades y condiciones mediadas por IG. Las hialuronidasas son una familia de enzimas que degradan el ácido hialurónico, el cual es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente importante del protector intersticial. Al catalizar la hidrólisis del ácido hialurónico, un constituyente importante del protector intersticial, hialuronidasa, baja la viscosidad del ácido hialurónico, incrementando así la permeabilidad del tejido. Como tal la hialuronidasa ha sido usada, por ejemplo, como un agente dispersante o impartidor de untuosidad conjuntamente con otros agentes, fármacos y proteínas para mejorar su dispersión y liberación. Hialuronidasas ejemplares en las combinaciones y métodos proporcionados en la presente son las

82

hialuronidasas solubles.

Hay tres clases generales de hialuronidasas; hialuronidasa de mamífero, hialuronidasa bacteriana y hialuronidasa de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas de tipo de mamífero (EC 3.2.1.35) son endo-β-N-acetil-hexoaminidasas que hidrolizan al enlace β1→4 glicosídico de hialuronano en varias extensiones de oligosacárido como tetrasacáridos y hexasacáridos. Ambos tienen actividades hidrolítica y transglicosidasa, y pueden degradar hialuronano y sulfatos de condroitina (CS), generalmente C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas de vacas (vacunas) (SEC ID NOS: 10 y 11), ratón (SEC ID NOS: 17-19, 32), cerdo (SEC ID NOS: 20-21), rata (SEC ID NOS: 22-24, 31), conejo (SEC ID NO: 25), oveja (ovina) (SEC ID NOS: 26 y 27), orangután (SEC ID NO: 28), mono cynomolgus (SEC ID NO: 29), cobayo (SEC ID NO: 30), y hialuronidass humanas.

Las hialuronidasas de mamífero pueden ser adicionalmente subdivididas en aquellas que son de neutro-activas, predominantemente encontradas en extractos de testículos, y ácido-activas, predominantemente encontradas en órganos como el hígado. Las hialuronidasas neutro-activas ejemplares incluyen PH20, que incluyen pero no se limitan a, PH20 derivado de diferentes especies como ovina (SEC ID NO:

27), bovina (SEC ID NO: 11) y humana (SEC ID NO: 1). La PH20 humana (también conocida como SPAM1 o PH20 de proteína de superficie espermática), está generalmente enclavada en la membrana plasmática vía una fijación glicosilfosfatidil inositol (GPI, siglas del inglés GlycosylPhosphatidyl Inositol). Está naturalmente involucrada en la adhesión huevo-esperma y ayuda a la penetración por el esperma de la capa de células de cúmulo al digerir el ácido hialurónico. El mARN trasncripto de PH20 es normalmente transladado para generar un polipéptido precursor de 509 aminoácidos (SEC ID NO: 1) que contiene una secuencia de señal de 35 aminoácidos en el terminus-N (posiciones de los residuos de aminoácido 1-35) y una fijación GPI de 19 aminoácidos en el terminus-C (posiciones de los residuos de aminoácidos 491-509). El PH20 maduro es, por consiguiente, un polipéptido de 474 aminoácidos expuestos en la SEC ID NO: 2). PH20 bovino es un polipéptido precursor de 553 aminoácidos (SEC ID NO: 11). La alineación del PH20 bovino con el PH20 humano muestra solamente débil homología, con múltiples espacios que existen desde el aminoácido 470 hasta el respectivo termini carboxi debido a la ausencia de una fijación GPI en el polipéptido bovino (véase por ejemplo, Frost GI (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4: 427-440). De hecho, ninguna fijación GPI clara es predicha en cualquier especie de PH20 junto a las humanas..

84

Por consiguiente, los polipéptidos de PH20 producidos a partir de ovinos y bovinos existen como formas solubles. Aunque la PH20 bovina existe muy débilmente fijada a la membrana plasmática, no está fijada vía una fijación sensible a fosfolipasa La Lancette y colaboradores, Biol. Reprod. Agosto de 2001; 65(2): 628-36). Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa de testículos bovinos soluble como un extracto para uso clínico (Wydase™, Hyalase™). Junto a PH20 humana (también denominada SPAM1), se han identificado en el genoma humano cinco genes similares a hialuronidasa, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y HYALP1. HYALP1 es un pseudogen, y HYAL3 (SEC ID NO:38) no ha mostrado poseer actividad enzimática hacia cualquiera de los sustratos conocidos. HYAL4 (polipéptido precursor expuesto en la SEC ID NO: 39) es una condroitinasa y exhibe poca actividad hacia hialuronano. HYAL1 (polipéptido precursor expuesto en la SEC ID NO: 36) es la enzima ácido-activa prototípica y PH20 (polipéptido precursor expuesto en la SEC ID NO: 1) es la enzima neutro-activa prototípica. Hialuronidasas ácido-activas, como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor expuesto en la SEC ID NO: 37) generalmente carecen de actividad catalítica a pH neutro (es decir pH de 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica in vitro a pH superior a 4.5 (Frost y colaboradores (1997) Anal.

85

Biochemistry, 251: 263-269). HYAL2 es una encima ácido-activa con una actividad específica muy baja in vitro. Las enzimas similares a hialuronidasas pueden también caracterizarse por aquellas que están generalmente enclavadas a la membrana plasmática vía una fijación glicosilfosfatidil inositol como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, y colaboradores (2003) Proc Natl Acad Sci USA. 100 (8):4580-5), y aquellas que son generalmente solubles como la HYAL1 humana (Frost y colaboradores, (1997) Biochem Biophys Res Commun.:236(1):10-5).

La glicosilación, incluyendo glicosilación N- y O-ligada, de algunas hialuronidasas puede ser muy importante para su estabilidad y actividad catalítica. Aunque altera el tipo de glicano que modifica a una glicoproteína, puede tener efectos sobre una anteginicidad de la proteína, pliegue estructural, solubilidad, y estabilidad, no se piensa que la mayoría de las enzimas requieran glicosilación para óptima actividad enzimática. Dichas hialuronidasas son únicas a este respecto, porque la remoción de la glicosilación N-ligada puede dar como resultado la inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. Para dichas hialuronidasas la presencia de glicanos N-ligados es crítica para generar una enzima activa.

Oligosacáridos N-ligados caen en varios tipos

importantes (oligomanosa, compleja, híbrida, sulfatada), todas las cuales tienen núcleos (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc fijados vía el nitrógeno de la amida de residuos Asn que caen en las secuencias Asn-Xaa-Thr/Ser- (donde Xaa no es Pro). La glicosilación en un sitio Asn-Xaa-Cys ha sido reportada para la proteína C de coagulación. En algunos casos , la hialuronidasa puede contener ambos enlaces N-glicosídico y O-glicosídico. Por ejemplo, PH20 tiene oligosacáridos O-ligados así como también oligosacáridos N-ligados.

Hay siete sitios potenciales de glicosilación N-ligados en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humana ejemplificados en la SEC ID NO: 1. se forman enlaces disulfuro entre los residuos cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 para formar el dominio hialuronidasa central. No obstante, se requieren cisteínas adicionales en el terminus carboxi para actividad catalítica de la enzima neutra de modo que los aminoácidos 36 a 464 de la SEC ID NO: 1 contienen el dominio hialuronidasa de PH20 humana mínimamente activa. Por consiguiente, el sitio N-490 de glicosilación N-ligada no se requiere para actividad hialuronidasa apropiada.

Hialuronidasa Soluble

Se proporcionan en las combinaciones y métodos de la presente hialuronidasas solubles. Las hialuronidasas solubles incluyen cualquiera que exista en forma soluble,

incluyendo, pero no limitándose a, HYAL1, PH20 bovina y PH20 ovina, variantes alélilas de éstas y otras variantes. También están incluidas entre las hialuronidasas cualquier hialuronidasa que haya sido modificada para ser soluble. Por ejemplo, PH20 humana, la cual normalmente está enclavada a membrana vía una fijación GPI, puede hacerse soluble por truncado de y remoción de toda o una porción de la fijación GPI en el terminus C. Las hialuronidasas solubles también incluyen hialuronidasas neutro-activas y ácido-activas, no obstante, las hialuronidasas neutro-activas son contempladas en la presente para propósitos de administración subcutánea.

Así, es ejemplar de hialuronidasa soluble PH20 de cualquier especie, como cualquiera de las expuestas en las SEC ID NOS: 1, 2, 11, 25, 27, 30 y 31, o formas truncadas de éstas que carecen de toda o una porción de la fijación GPI C terminal, mientras que la hialuronidasa sea soluble y retenga la actividad hialuronidasa. También se incluyen entre las hialuronidasas solubles las variantes alélicas u otras variantes de cualquiera de las SEC ID NOS: 1, 2, 11, 25, 27, 30 y 31, o formas truncadas de éstas. Las variantes alélilas y otras variantes son conocidas pro los expertos en el arte, e incluyen polipéptidos que tengan 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEC ID NOS: 1, 2, 11, 25, 27, 30 y 31 o

formas truncadas de éstas.

Típicamente, para uso en los métodos de la presente se usó una PH20 humana soluble. Aunque puede utilizarse PH20 de otros animales, dichas preparaciones son potencialmente inmunogénicas, ya que son proteínas animales. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demostraron sensibilidad secundaria previa a la ingesta de alimentos, y ya que éstas son proteínas animales, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización subsecuente. Por consiguiente, preparaciones no humanas pueden no ser adecuadas para uso crónico. Si se desean preparaciones no humanas, se contempló en la presente que dichos polipéptidos puedan ser preparados para tener inmunogenicidad reducida. Dichas modificaciones están en el nivel de un experto en el arte. Las hialuronidasas, incluyendo PH20, usadas en los métodos de la presente pueden ser producidas recombinantemente o pueden ser purificadas o parcialmente purificadas a partir de fuentes naturales, como, por ejemplo, desde extractos de testículos.

PH20 Humana Soluble

Ejemplar de una hialuronidasa soluble es PH20 humana soluble. E han producido las formas solubles de PH20 humana recombinante y pueden ser usadas en los métodos descritos en la presente para co-administración o co-

formulación con inmunoglobulina para administración subcutánea para tratar enfermedades y condiciones tratables con IG. La producción de dichas formas solubles de PH20 se describe en las Solicitudes Nos. 11/065,716 y 11/238,171, y en los Ejemplos 2 - 6 posteriores. Las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera que tenga truncaciones C terminales para generar polipéptidos que contengan los aminoácidos 1 al aminoácido 347, 372, 394, 413, 430, 447, 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 1. Cuando se expresa en células de mamífero la secuencia de señal de 35 aminoácidos N terminales es fragmentada durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína es secretada. Así, los polipéptidos solubles maduros contienen los aminoácidos 36 a 347, 372, 394, 413, 430, 447, 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de la SEC ID NO: 1. Los mutantes finales por eliminación en la posición del aminoácido 477 a 483 (correspondientes al polipéptido precursor expuesto en la SEC ID NO: 1) exhiben mayor actividad hialuronidasa secretada que la forma enclavada en GPI de extensión total. Por lo tanto, ejemplares de hialuronidasas solubles son aquellas que son de 442, 443, 444, 445, 446 y 447 aminoácidos de extensión, como se expone en las SEC ID NOS: 4-9, o variantes alélicas o de especies u otras variantes de éstas.

Generalmente, formas solubles de PH20 son producidas usando sistemas de expresión de proteínas que facilitan la N-glicosilación correcta para asegurar que el polipéptido retenga actividad, ya que la glicosilación es importante para la actividad catalítica y la estabilidad de las hialuronidasas. Dichas células incluyen, por ejemplo células de ovario de cobayo (CHO) (por ejemplo, células DG44 de CHO).

PH20 Recombinante Humana Soluble (rHuPH20)

Se han generado las formas solubles recombinantes de PH20 humana (rHuPH20 soluble) y pueden ser producidas y purificadas usando los métodos descritos en la presente. La generación de dichas formas solubles de rHuPH20 se describe en la Solicitud de Patente U.S. Nos. 11/065,716 y 11/238,171 (publicadas como solicitudes de patentes publicadas U.S. Nos. US 2005/0260186 y US 2006/0104968), y en los Ejemplos 2-6 posteriores. Ejemplares de dichos polipéptidos son aquellos generados a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica a los aminoácidos 1-482 expuestos en la SEC ID NO: 3. El procesamiento post-translacional remueve la secuencia de señal de 35 aminoácidos, dando como resultado la secreción de una rHuPH20 soluble de 447 aminoácidos (SEC ID NO: 4). La rHuPH20 purificada resultante puede ser heterogénea debido a peptidasas presentes en el medio de cultivo, después de la producción y purificación. Típicamente, rHuPH20 es producida

en células que facilitan la N-glicosilación correcta para retener la actividad, como células CHO (por ejemplo células DG44 de CHO).

E.Métodos de Producir Acidos Nucleicos que Codifican a una Hialuronidasa Soluble y a Polipéptidos de Esta

Pueden obtenerse polipéptidos de una hialuronidasa soluble expuesta en la presente por medio de métodos bien conocidos en el arte por purificación de proteínas y expresión recombinante de proteínas. Puede usarse cualquier método conocido por los expertos en el arte para identificación de ácidos nucleicos que codifican a genes deseados. Cualquier método disponible en el arte puede ser usado para obtener un clon de ADN genómico o de cADN de extensión total (es decir, que abarca la región codificadora entera) que codifica a una hialuronidasa, como desde una fuente de célula o de tejido. Las hialuronidasas solubles variantes o modificadas, pueden ser diseñadas a partir de un polipéptido de tipo salvaje, como por mutagénesis en sitio puntual.

Los polipéptidos pueden ser clonados o aislados usando cualquier método conocido en el arte para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Dichos métodos incluyen amplificación por PCR de ácidos nucleicos y cribado de

bibliotecas, incluyendo cribado por hibridización de ácido nucleico, cribado basado en anticuerpos y cribado basado en actividad.

Pueden usarse métodos para amplificación de ácidos nucleicos para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican a un polipéptido deseado, incluyendo, por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un material que contiene ácido nucleico puede ser usado como un material inicial desde el cual puede ser aislada una molécula de ácido nucleico que codifica al polipéptido. Por ejemplo, pueden usarse en métodos de amplificación, preparaciones de ADN y de mARN, extractos celulares, extractos de tejido, muestras de fluido (por ejemplo, sangre, suero, saliva), muestras de sujetos saludables y/o enfermos. Pueden usarse bibliotecas de ácidos nucleicos como una fuente de material inicial. Los cebadores pueden ser diseñados para amplificar a un polipéptido deseado. Por ejemplo, los cebadores pueden ser diseñados basados en secuencias expresadas a partir de las cuales es generado un polipéptido deseado. Los cebadores pueden ser diseñados basados en retro-translación de una secuencia de aminoácidos polipeptídicos. Moléculas de ácidos nucleicos generadas por amplificación pueden ser secuenciadas y confirmadas para codificar a un polipéptido deseado.

Moléculas de nucleótidos adicionales pueden ser

unidas a una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido, incluyendo secuencias enlazadoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción para el propósito de clonar al en sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para la amplificación de secuencias de ADN que codifican al núcleo proteínico. Además, secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales pueden ser enlazadas operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido. Ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de la proteína intracelular, y secuencias de secreción, por ejemplo, secuencias de señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción proteínica. Dichas secuencias son conocidas por los expertos en el arte. Secuencias de residuos de nucleótidos adicionales como las secuencias de bases que indican regiones de enlace proteínico también pueden ser enlazadas a moléculas de ácido nucleico que codifican a una enzima. Dichas regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la captación de una enzima en células objetivo especificas, o de otra manera alteran la farmacocinética de un producto de un gen sintético. Por ejemplo, enzimas pueden ser enlazadas a

porciones de PEG.

Además, pueden añadirse marcas u otras porciones, por ejemplo para ayudar en la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, secuencias de residuos de nucleótidos adicionales como secuencias de bases que indican una marca de epítope u otro marcador detectable también pueden ser enlazadas a moléculas de ácidos nucleicos que codifican a una enzima. Ejemplares de dichas secuencias incluyen secuencias de ácidos nucleicos que codifican a una marca His (por ejemplo, 6xHis, HHHHHH; SEC ID NO: 54) o Marca Señalizadora (DYKDDDDK; SEC ID NO: 55).

Los ácidos nucleicos aislados e identificados pueden entonces ser insertados en un vector de clonación apropiado. Pueden usarse numerosos sistemas de huésped-vector conocidos en el arte. Posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema del vector debe de ser compatible con la célula huésped usada. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos como derivados lambda, o plásmidos como pCMV4, pBR322 o derivados del plásmido pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ejemplificado en la presente. La inserción en un vector de clonación puede, por ejemplo, lograrse ligando el fragmento de ADN en un vector de

clonación que tenga un termini cohesivo complementario. La inserción puede efectuarse usando vectores de clonación TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden ser modificados enzimáticamente. Alternativamente, cualquier sitio deseado puede ser producido ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) sobre el termini del ADN; estos enlazadores ligados pueden contener oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican a secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el vector fragmentado y el gen proteínico pueden ser modificados por adición de una cola homopolimérica. Pueden introducirse moléculas recombinantes en células huéspedes vía, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generen muchas copias de la secuencia del gen.

En modalidades específicas, la transformación de células huéspedes con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen proteínico aislado, cADN, o secuencias de ADN sintetizado facilitan la generación de muchas copias del gen. Así, el gen puede ser obtenido en grandes cantidades por crecimiento de transformantes, aislamiento de las moléculas

de ADN recombinante a partir de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperación del gen insertado a partir del ADN recombinante aislado.

1.Vectores y Células

Para expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, como cualquiera descrita en la presente, el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia del nucleótido que codifica a la proteína puede ser insertado en un vector de expresión adecuado, es decir un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y translación de la secuencia que codifica a la proteína insertada. Las señales translacionales y transcripcionales necesarias también pueden ser suministradas por el promotor nativo para genes enzimáticos, y/o sus regiones de flanqueo.

También se proporcionan vectores que contienen un ácido nucleico que codifica a la enzima. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células procarióticas y eucarióticas, y los vectores son cualquiera de los adecuados para uso en la presente.

Se porporcionan células procarióticas y eucarióticas, incluyendo células endoteliales, que contienen los vectores. Dichas células incluyen células bacterianas, células de levaduras, células de hongos, Archea, células

vegetales, células de insectos y células animales. Las células son usadas para producir una proteína de ésta por crecimiento de las células anteriormente descritas bajo condiciones en las cuales es expresada la proteína codificada por la célula, y recuperando la proteína expresada. Para propósitos de la presente, por ejemplo, las enzimas pueden ser secretadas en el medio.

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido de la hialuronidasa soluble acoplado a la secuencia de señal heteróloga o nativa, así como también múltiples copias de éstos. Los vectores pueden ser seleccionados para expresión de la proteína enzimática en la célula o de modo que la proteína enzimática sea expresada como una proteína secretada.

Puede usarse una variedad de sistemas huésped-vector para expresar a la secuencia que codifica a la proteína. Estos incluyen pero nos e limitan a sistemas celulares de mamíferos infectados con virus (por ejemplo, virus de la viruela, adenovirus u otros virus); sistemas celulares de insectos infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos como levaduras que contienen vectores de levaduras; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plásmido, o ADN cósmido. Los

elementos de expresión de vectores varían en su fuerza y especificidades. Dependiendo del sistema huésped-vector usado, puede usarse cualquiera de los numerosos elementos de transcripción y translación.

Puede usarse cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en el arte para la inserción de fragmentos de ADN en un vector para construir vectores de expresión que contengan un gen quimérico que contenga las señales de control transcripcional/translacional apropiadas y secuencias que codifiquen a la proteína. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante in vitro y sintéticas y recombinantes in vivo (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican ala proteína, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de ésta, puede ser regulada por una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de ésta sean expresados en huésped transformado con la(s) molécula(s) de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede ser controlada por medio de cualquier promotor/mejorador conocido en el arte. En una modalidad específica, el promotor no es nativo a los genes para una proteína deseada. Promotores que pueden ser usados incluyen pero no se limitan al promotor precoz de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en

la repetición terminal a lo largo de 3' del virus de sarcoma de Rous (Yamamoto y colaboradores Cell 22: 787-797 (1980)), el promotor quinasa timidina del herpes (Wagner y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneina (Brinster y colaboradores, Nature 296:39-42 (1982)); vectores de expresión procarióticos como el promotor β-lactamasa (Jay y colaboradores (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543) o el promotor tac (DeBoer y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); ver también "Usefull Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242:79-94 (1980)); vectores de expresión de vegetales que contienen el promotor nopalina sintetasa (Herrara-Estrella y colaboradores, Nature 303:209-213 (1984)) o el promotor 35S ARN del virus mosaico del coliflor (Garder y colaboradores, Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética bifosfato de ribulosa carboxilasa (Herrera-estrella y colaboradores, Nature 310:115-120 (1984)); elementos promotores a partir de levaduras y otros hongos como el promotor GAL4, el promotor alcohol deshidrogenasa, el promotor fosfoglicerol quinasa, el promotor fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional animal que exhiben especificidad de tejido y han sido usadas en animales transgénicos: región de

control del gen de elastasa I que está activa en células acinares pancreáticas (Swift y colaboradores, cell 38: 639-646 (1984); Ormitz y colaboradores, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); Mac Donald, Hepatology 7:425-515 (1987)); región control del gen de insulina la cual está activa en células beta pancreáticas (Hanahan y colaboradores, Nature 315:115-122 (1985)), región de control del gen de inmunoglobulina la cual está activa en células linfoides (Grosschedln y colaboradores, Cell 38:647-658 (1984); Adams y colaboradores, Nature 318:533-538 (1985); Alexander y colaboradores, Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), región de control del virus de tumor mamario de ratón, la cual está activa en mastocitos, células linfoides, de seno y testiculares (Leder y colaboradores, Cell 45:485-495 (1986)9, región de control del gen de albúmina la cual está activa en hígado (Pinkert y colaboradores, Genes y Devel. 1:268-276 (1987)), región de control del gen de alfa-fetoproteína la cual está activa en hígado (KrumLauf y colaboradores, Mol. Cell Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer y colaboradores, Science 235:53-58 (1987)), región de control del gen de alfa-1 antitripsina la cual está activa en hígado (Kelsey y colaboradores, Genes y Devel. 1:161-171 (1987)), región de control del gen de beta-globulina la cual está activa en células mieloides (Magram y colaboradores, Nature 315:338-340

(1985); Kollias y colaboradores, Cell 46:89-94 (1986)), región de control del gen de la proteína básica de mielina la cual está activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead y colaboradores, Cell 48:703-712 (1987)), región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina la cual está activa en el músculo esquelético (Shani, Nature 314:283-286 (1985)), y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrófica la cual está activa en gonadotrofos del hipotálamo (Mason y colaboradores, Science 234:1372-1378 (1986)).

En una modalidad específica, se usa un vector que contiene un promotor ligado operablemente a ácidos nucleicos que codifican a una proteína deseada, o a un dominio, fragmento, derivado u homólogo de ésta, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Vectores plásmidos ejemplares para transformación de células E. coli, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también la literatura publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor Fago T5 (reconocido por ARN polimerasa de E. coli) y un doble módulo de represión del operador lac para proporcionar expresión de alto nivel, ligeramente regulada de proteínas

recombinantes en *E. coli,* un sitio de enlace ribosómico sintético (RBS II) para translación eficiente, una secuencia que codifica a la marca 6Xhis, terminadores transcripcionales t_o y T_1, origen de replicación ColE1, y un gen de beta lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE facilitan la colocación de la marca 6xHis ya sea en el terminus N- o bien en el C- de la proteína recombinante. Dichos plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 los cuales proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres macros de lectura y se proporcionan para la expresión de proteínas marcadas con 6xHis N-terminalmente. Otros vectores plásmidos ejemplares para la transformación de células de E. coli, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase la Patente U.S. 4,952,496, disponible de NOVAGEN, Madison, WI; véase, también la literatura publicada por Novagen que describe el sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, el cual contiene el promotor T7lac, terminador T7, el operador lac de *E. coli* inducible, y el gen represor lac, pET 12a-c, el cual contiene al promotor T7, terminador T7, y la señal de secreción ompT de E. coli; y pET 15b y pET 19b (NOVAGEN, Madison, WI), el cual contiene una secuencia líder His-Tag™ para uso en purificación con una columna de His y un sitio de fragmentación de trombina que permite la fragmentación después de purificación sobre la

columna , la región promotora lac-T7 y el terminador T7.

Ejemplar de un vector para expresión de células de mamíferos es el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 fue derivado de la estructura principal del vector pCI (Promega). Contiene ADN que codifica al gen de resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un orígen de replicación FI, una región promotora/mejoradora precoz/inmediata de citomegalovirus (CMV), y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El vector de expresión también tiene un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) a partir del virus de ECMV (Clontech) y el gen de dihidrofoliato reductasa de ratón (DHFR).

2.Expresión

Los polipéptidos de hialuronidasa soluble pueden ser producidos por medio de cualquier método conocido por el experto en el arte incluyendo métodos in vivo e in vitro. Las proteínas deseadas pueden ser expresadas en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas requeridas de las proteínas, como por ejemplo, necesarias para administración y tratamiento. Los huéspedes de expresión incluyen organismos procarióticos y eucarióticos como E. coli, levaduras, plantas, células de insectos, células de mamíferos, incluyendo líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los huéspedes de expresión pueden diferir en

sus niveles de producción de proteínas así como también los tipos de modificaciones post-translacionales que están presentes sobre la proteína expresada. La selección del huésped de expresión puede hacerse con base en estos y otros factores, como consideraciones de seguridad y reguladoras, costos de producción y la necesidad y métodos de purificación.

Muchos vectores de expresión están disponibles y son conocidos por los expertos en el arte y pueden ser usados para expresión de proteínas. La selección del vector de expresión será influenciado por la selección del sistema de expresión del huésped. En general, vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente mejoradores, señales translacionales, y señales de terminación translacional y transcripcional. Vectores de expresión que son usados para transformación estable típicamente tienen un marcador seleccionable que permite la selección y mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, puede usarse un orígen de replicación para amplificar el número de copias del vector.

Polipéptidos de hialuronidasa soluble también pueden ser utilizados o expresados como fusiones proteínicas. Por ejemplo, puede generarse una fusión enzimática para añadir funcionalidad adicional a una enzima. Ejemplos de

proteínas de fusión enzimática incluyen, pero no se limitan a fusiones de una secuencia de señal, una marca para localización, por ejemplo, una marca his o una marca myc, o una marca para purificación, por ejemplo, una fusión GST, y una secuencia para dirigir la secreción de la proteína y/o asociación de membrana.

a.Células Procarióticas

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 por los expertos en el arte. Los vectores de expresión para E. coli pueden contener promotores inducible, dichos promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que exhiban alguna toxicidad para las células huéspedes. Ejemplos de promotores inducibles incluyen al promotor lac, al promotor trp, al promotor tac híbrido, y a los promotores T7 y SP6 ARN y al promotor λPL regulado por temperatura.

Proteínas, como cualquiera de las proporcionadas en la presente, pueden ser expresadas 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.

Agentes reductores como ditiotreitol y β-mercaptoetanol y desnaturalizantes, tales como clorhidrato de guanidina y urea pueden ser usados para resolubilizar las proteínas. Un procedimiento alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias que proporcionan un ambiente oxidante y similar a la chaperonina y disulfuro isomerasas y pueden conducir a la producción de la proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder es fusionada a la proteína para ser expresada, la cual dirige a la proteína al periplasma. La líder es entonces removida por medio de peptidasas de señal en el interior del periplasma. Ejemplos de secuencias líder que tienen como objetivo el periplasma incluyen la líder pe1B del gen del pectato liasa y la líder derivada del gen de fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la dispersión de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de proteínas permite la purificación rápida y simple a partir del sobrenadante de cultivo. Proteínas que no son secretadas pueden ser obtenidas a partir del periplasma por medio de lisis osmótica. Similar a la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y pueden usarse agentes desnaturalizantes y reductores para facilitar la solubilización y re-doblamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede influir los niveles

de expresión y la solubilidad, típicamente se usan temperaturas entre 25 °C y 37 °C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por consiguiente, si las proteínas requieren glicosilación ara funcionar, la glicosilación puede ser añadida in vitro después de purificación a partir de células huéspedes.

b.Células de Levaduras

Levaduras como *Sacharomyces cerevisae, Schizosacharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Kluyveromyces lactis y Pichia pastoris* son levaduras huéspedes de expresión bien conocidas que pueden ser usadas para producción de proteínas, como cualquiera de las descritas en la presente. Las levaduras pueden ser transformadas con vectores de replicación episomales o por medio de integración cromosómica estable por recombinación homóloga. Típicamente, se usan promotores inducibles para regular la expresión genética. Ejemplos de dichos promotores incluyen los promotores de GAL1, GAL7 y GAL5 y de metalotioneína, como CUP1, AOX1 u otro promotor de Pichia u otra levadura. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador seleccionable como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para selección y mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levaduras son a menudo solubles. La co-expresión con chaperoninas como Bip y la proteina disulfuro isomerasa puede mejorar los niveles de

expresión y la solubilidad. Adicionalmente, proteínas expresadas en levaduras pueden ser dirigidas para secreción usando fusiones de péptidos de señal de secreción como la señal de secreción del factor-alfa del tipo conjugado a levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie celular de levaduras como el receptor de adhesión conjugado a Aga2p o la glucoamilasa de Arxula adeninivorans. Un sitio de fraccionamiento de proteasa como el Kex-2 proteasa, puede ser diseñado para remover las secuencias fusionadas a partir delos polipéptidos expresados como salen de la trayectoria de secreción. Las levaduras también son capaces de glicosilación en los motivos Asn-X-Ser/Thr.

c.Células de Insectos

Las células de insectos, particularmente usando expresión en baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos como polipéptidos de hialuronidasa. Las células de insectos expresan altos niveles de proteínas y son capaces de la mayor parte de las modificaciones post-translacionales usadas por eucariotas superiores. Baculovirus tiene un intervalo de huéspedes restrictivo, lo cual mejora la seguridad y reduce las consecuencias reguladoras de la expresión eucariótica. Vectores de expresión típica usan un promotor para expresión de alto nivel como el promotor

polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus usados comúnmente incluyen baculovirus como *Autographa californica*, virus de polihedrosis nuclear (AcNPV, siglas del inglés Autograpa californica Nuclear Polihedrosis Virus), y el *Bombyx mori* nuclear polihedrosis virus (BmNPV, siglas del inglés *Bombyx mori* Nuclear Polihedrosis Virus) y una línea celular de insectos como Sf9, derivada de *Spodoptera frugiperda, Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danus plexippus* (DpN1). Para expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula a ser expresada es fusionada inmediatamente en la dirección del extremo amino libre hacia el extremo carboxi libre del codón de iniciación de polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos son procesadas precisamente en células de insectos y pueden ser usadas para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas celulares Pseudaletia unipuncta (A7S) y Danaus plexipus (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a sistemas celulares de mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en células de insectos es el uso de células transformadas establemente. Líneas celulares como las células Schneider 2 (S2) y Kc (Drosophila melanogaster) y células C7 (Aedes albopictus) pueden ser usadas para expresión. El promotor netalotioneina

de Drosophila puede ser usado para inducir altos niveles de expresión en la presencia de inducción por metales pesados con cadmio o cobre. Vectores de expresión son típicamente mantenidos por el uso de marcadores seleccionables como neomicina e higromicina.

d.Células de Mamíferos

Sistemas de expresión de mamíferos pueden ser usados para expresar proteínas incluyendo polipéptidos de hialuronidasa soluble. Construcciones para expresión pueden ser transferidas a células de mamíferos por infección viral como adenovirus o por transferencia de ADN directa como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos como electroporación y microinyección. Vectores de expresión para células de mamíferos incluyen típicamente un sitio de encapsulación de mARN, un bloque TATA, una secuencia de iniciación translacional (secuencia consensus de Kozac) y elementos de poliadenilación. También pueden añadirse elementos IRES para permitir la expresión bicistrónica con otro gen, como un marcador seleccionable. Dichos vectores a menudo incluyen mejoradores-promotores transcripcionales para expresión de alto nivel, por ejemplo, el mejorador-promotor de SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV) humano y la repetición terminal prolongada del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos mejoradores-promotores son activos en muchos

JLL

tipos de células. También pueden ser usados para expresión regiones mejoradoras y promotores de tipo celular y tisular. Regiones mejoradoras/promotoras ejemplares incluyen, pero no se limitan a, aquellas de los genes como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón. Albúmina, alfa fetoproteína, antitripsina alfa 1, beta-globina, proteína básica de mielina, cadena ligera 2 de miosina, y control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica. Pueden usarse marcadores seleccionables para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforibosil transferasa, aminoglicósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Por ejemplo, la expresión puede ser efectuada en la presencia de metotrexate para seleccionar solamente aquellas células que expresan al gen de DHFR. La fusión con moléculas señalizadoras de superficie celular como TCR-ξ y Fc_t-RI-γ pueden dirigir la expresión de proteínas en un estado activo sobre la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas celulares para expresión de mamíferos, incluyendo células de ratón, rata, humano, mono, pollo y de hámster. Las líneas celulares

ejemplares incluyen pero no se limitan a CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretoras) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, células de linfocitos, fibroblastos, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8, y HKB. Las líneas celulares están disponibles adaptadas para medio libre de suero lo cual facilita la purificación de las proteínas secretadas desde el medio de cultivo celular. Ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, # de cat. 11619-012) y la línea celular EBNA-1 libre de suero (Pham y colaboradores, (2003) Biotechnol., Bioeng. 84:32-42). Las líneas celulares también están disponibles que estén adaptadas a crecer en medio especial optimizado para expresión máxima. Por ejemplo, células DG44 CHO están adaptadas para crecer en cultivo en suspensión en un medio químicamente definido, libre de producto animal.

e.Vegetales

Células vegetales transgénicas y plantas pueden ser usadas para expresar proteínas como cualquiera descrita en la presente. Construcciones de expresión son típicamente transferidas a plantas usando transferencia directa de ADN como bombardeo de microproyectil y transferencia mediada por PEG en protoplastos, y con transformación mediada por *agrobacterium.* Los vectores de expresión pueden incluir

secuencias mejoradoras y promotoras, elementos de terminación transcripcional y elementos de control translacional. Vectores de expresión y técnicas de transformación son usualmente divididas entre huéspedes dicotiledóneos, como Arabidopsis y tabaco, y huéspedes monocotiledóneos, como maíz y arroz. Ejemplos de promotores vegetales usados para expresión incluyen el promotor del virus mosaico de colifor, el promotor nopalina sintasa, el promotor bifosfato de ribosa carboxilasa y los promotores ubiquitina y UBQ3. A menudo son usados marcadores seleccionables como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa, para facilitar la selección y mantenimiento de células transformadas. Células vegetales transformadas pueden ser mantenidas en cultivo como células, aglomerados (tejido calloso) o regenerado en plantas enteras. Células vegetales transgénicas también pueden incluir algas diseñadas para producir polipéptidos de hialuronidasa. Porque las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que células de mamíferos, esto puede influir la selección de la proteína producida en estos huéspedes.

3.Técnicas de Purificación

El método para purificación de polipéptidos, incluyendo polipéptidos de hialuronidasa soluble u otras proteínas, a partir de células huéspedes depender-a de las

células huéspedes y de los sistemas de expresión seleccionados. Para moléculas secretadas, las proteínas son purificadas generalmente a partir del medio de cultivo después de remoción de las células. Para expresión intracelular, las células pueden ser lisadas y las proteínas purificadas a partir del extracto. Cuando organismos transgénicos como vegetales y animales transgénicos son usados para expresión, tejidos u órganos pueden ser usados como material inicial para elaborar un extracto celular lisado. Adicionalmente la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos los cuales pueden ser colectados, y si es necesario, las proteínas pueden ser extraídas y purificadas adicionalmente usando métodos estándares en el arte.

Las proteínas, como polipéptidos de hialuronidasa soluble, pueden ser purificadas usando técnicas de purificación de proteínas estándares conocidas en el arte que incluyen pero no se limitan a, SDS-PAGE, cromatografía por exclusión de tamaño y fracción de tamaño, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía por intercambio iónico, como intercambio aniónico. Las técnicas de purificación por afinidad también pueden ser utilizadas para mejorar la eficiencia y la pureza de las preparaciones. Por ejemplo, anticuerpos, receptores y otras moléculas que enlazan a

enzimas hialuronidasas pueden ser usados en purificación por afinidad. Construcciones para expresión también pueden ser diseñados para añadir una marca de afinidad a una proteína como un epítope myc, fusión GST o His_6 y purificada por afinidad con el anticuerpo de myc, la resina glutatión y la resina Ni respectivamente.. La pureza puede ser evaluada por cualquier método conocido en el arte incluyendo técnicas de electroforesis sobre gel y de tinción y espectrofotométricas.

F.Preparación, Formulación y Administración de Inmunoglobulinas y Polipéptidos de Hialuronidasa Soluble

Se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas de inmunoglobulinas y hialuronidasas solubles para administración subcutánea. Las formulaciones de composiciones farmacéuticas de hialuronidasas, por ejemplo, PH20, son conocidas en el arte (véase, por ejemplo, Solicitudes U.S. Nos. US2004/0268425, US2005/0260186 y US2006/0104968). Las hialuronidasas son co-formuladas o co-administradas con formulaciones farmacéuticas de inmunoglobulina para mejorar la liberación de inmunoglobulinas en sitios deseados en el cuerpo incrementando la biodisponibilidad de inmunoglobulinas. Por ejemplo, la co-administración o co-formulación de IG con una hialuronidasa puede mejorar el grado y/o la velocidad de absorción y por consiguiente la biodisponibilidad de un

agente causando que más de él, alcance el torrente sanguíneo y/o menos de él, sea degradado después de administración por permeación más rápida. Lograrse absorción y biodisponibilidad crecientes, por ejemplo, acelerando el flujo intersticial y potencialmente el transporte colectivo después de administración por aplicación de presión hidrostática asociada con inyección del volumen combinada la reducción en la impedancia para flujo asociado con la degradación de hialuronano. Por consiguiente, pueden usarse hialuronidasas solubles para lograr concentraciones elevadas y/o más rápidamente logradas de la inmunoglobulina después de administración subcutánea en comparación con métodos convencionales de administración subcutánea, para proporcionar, por ejemplo, una respuesta más potente y/o más rápida para una dosis dada. Alternativamente, la hialuronidasa soluble puede ser usada para permitir una respuesta dada sea lograda con una dosis más baja de IG administrada. La habilidad de una hialuronidasa soluble para mejorar el flujo de fluido global en y cerca de un sitio de inyección o infusión también puede mejorar otros aspectos de la liberación farmacológica asociada. Por ejemplo, el incremento el flujo de fluido global puede ayudar a permitir que el volumen de fluido inyectado sea más fácilmente dispersado desde el sitio de inyección (reduciendo dolor

potencial u otras consecuencias adversas de la inyección). Esto es particularmente importante para infusiones subcutáneas para permitir que dosis más altas sean administradas. Además de la biodisponibilidad creciente, la co-administración o co-formulación de IG con hialuronidasa soluble proporciona una ruta de administración más conveniente o más segura en comparación con las rutas de administración intravenosas convencionales.

Por consiguiente, en virtud de la biodisponibilidad creciente, las inmunoglobulinas pueden ser administradas subcutáneamente a dosificaciones y frecuencias para las cuales las preparaciones intravenosas (IVIG) corrientes son preparadas y administradas. Las ventajas sobre las formulaciones subcutáneas corrientes de IG es que Hialuronidasa/IG co-administrada o co-formulada puede dar como resultado regímenes de dosificación más favorables, por ejemplo, dosificación menos frecuente, Por menos frecuente o dosificación más baja, los efectos secundarios asociados con la toxicidad pueden ser reducidos. Generalmente, la farmacocinética y/o farmacodinámica de la terapia con IG subcutánea es mejorada. Además, administraciones subcutáneas de IG también tienen ventajas sobre las infusiones intravenosas corrientes. Por ejemplo, la infusión subcutánea permite la infusión por el paciente o la familia

opuestamente a una enfermera experta, la infusión puede lograrse a velocidades más altas de modo que la IG sea infusionada en 1-3 horas en vez de 5 - 10 horas para terapias IVIG convencionales; no hay requerimiento para venas funcionales; no hay efectos secundarios relacionados con la infusión, como trombosis, jaqueca, tromboflebitis, y náuseas y menos probabilidad de eventos adversos; y la infusión puede efectuarse en casa o en cualquier parte.

Las composiciones pueden ser formuladas en forma líquida o, liofilizada. Cuando las composiciones son proporcionadas en forma liofilizada pueden ser reconstituidas justamente antes de uso por medio de un regulador apropiado, por ejemplo, una solución salina estéril. Las composiciones pueden ser proporcionadas juntas o separadamente. Para propósitos de la presente, dichas composiciones típicamente se proporcionan separadamente. La hialuronidasa soluble y la IG pueden ser empacadas como composiciones separadas para administración juntas, secuencial o intermitentemente. Las composiciones pueden ser empacadas como un equipo.

1.Formulaciones

Los compuestos pueden ser formulados en cualquiera de las preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración subcutánea como soluciones, suspensiones, polvos, o formulaciones de liberación sostenida. Típicamente,

los compuestos son formulados en composiciones farmacéuticas que usan técnicas y procedimientos bien conocidos en el arte (véase por ejemplo, Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta Edición, 1985, 126). Las composiciones farmacéuticas aceptables son preparadas en vista de aprobaciones para una agencia reguladora u otra agencia preparada de conformidad con la Farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y en humanos. La formulación deberá adaptarse al modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores como diluyentes, adyuvantes, excipientes, o vehículos con los cuales la hialuronidasa o la IG es administrada. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad efectiva terapéuticamente del compuesto, generalmente en forma purificada o en forma parcialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de portador de modo de proporcionar la forma para administración apropiada al paciente. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo aquellos de orígen animal, vegetal, de petróleo o sintético, como aceite de cacahuate, aceite de semilla de soya, aceite mineral, y aceite de sésamo. El agua es un portador típico cuando la composición

farmacéutica es administrada intravenosamente. También pueden emplearse soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol, como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un ingrediente activo: un diluyente como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, o carboximetil celulosa; un lubricante, como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante como almidón, gomas naturales, como goma arábiga, gelatina, glucosa, molasas, polivinil pirrolidina, celulosas y derivados de éstas, povidona, crospovidonas y otras aglutinantes diferentes conocidos por el experto en el arte. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, carbonato cálcico, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsificantes, o agentes reguladores del pH, por ejemplo acetato de sodio, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaureato de sorbitan, trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros de dichos agentes.

Los compuestos activos terapéutica y farmacéuticamente y derivados de éstos son formulados

típicamente y administrados en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Cada dosis unitaria contiene una cantidad pre-determinada de compuesto activo terapéuticamente suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Ejemplos de formas de dosis unitaria incluyen ampolletas y jeringas y tabletas o cápsulas empacadas individualmente. Las formas de dosis unitaria pueden ser administradas en fracciones o múltiples de éstas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitaria idénticas empacadas en un contenedor individual para ser administrada en forma de dosis unitaria segregada. Ejemplos de formas de dosis múltiple incluyen frasquitos, botellas de tabletas o cápsulas o botellas de pintas o galones. Por lo tanto, forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitaria que no son segregadas al empacar. Generalmente, pueden prepararse formas de dosificación o composiciones que contienen ingrediente activo en el intervalo de 0.005 % a 100 % con el equilibrio hecho de portador no tóxico.

Las composiciones proporcionadas en la presente típicamente son formuladas para administración por la ruta subcutánea, aunque se contemplan otras rutas de administración, como cualquier ruta conocida por el experto

en el arte incluyendo inyección intramuscular, intravenosa, intradérmica, intralesiones, inyección intraperitoneal, administración epidural, nasal, oral, vaginal, rectal, tópica, local, ótica, inhalacional, bucal (por ejemplo, sub-lingual) y transdérmica o cualquier ruta. Formulaciones adecuadas para dichas rutas son conocidas por un experto en el arte. La administración puede ser local, tópica o generalizada dependiendo del locus del tratamiento. La administración local a un área en necesidad de tratamiento puede lograse, por ejemplo, pero no limitándose a, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo conjuntamente con un apósito de herida después de cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante. Las composiciones pueden ser administradas con otros agentes activos biológicamente, ya sea secuencial o intermitentemente o en la misma composición. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada incluyendo formulaciones de liberación controlada y dispositivos de liberación controlada, como por medio de una bomba.

La ruta más adecuada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores, como la naturaleza de la enfermedad, el progreso de la enfermedad, la severidad de la enfermedad, la composición particular que es usada. Para

propósitos de la presente, se desea que la hialuronidasa sea administrada de modo que alcance el intersticio de piel o tejidos, degradando así el espacio intersticial, por liberación subsecuente de inmunoglobulina. Por consiguiente, se contempló la administración directa bajo la piel, como por métodos de administración subcutánea. Así, en un ejemplo, la administración local puede lograrse por inyección, como desde una jeringa u otro artículo de fabricación que contenga un dispositivo de inyección como una aguja. En otro ejemplo, la administración local puede lograrse por infusión, la cual puede ser facilitada por medio del uso de una bomba u otro dispositivo similar. También se contemplan otros modos de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas en formas de dosificación apropiadas para cada ruta de administración.

Se contempla en la presente la administración subcutánea, generalmente caracterizada por inyección o infusión. Los inyectables pueden ser preparados en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de inyección, o como emulsiones. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las composiciones farmacéuticas pueden contener otras cantidades menores de sustancias auxiliares no

tóxicas como agentes humectantes o emulsificantes, agentes reguladores de pH, estabilizantes, mejoradores de solubilidad, y otros de dichos agentes, como por ejemplo, acetato de sodio, monolaureato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. Se contempla también en la presente la implantación de un sistema de liberación sostenida o lenta, de modo que un nivel constante de dosificación sea mantenido (véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 3,710,795). El porcentaje de compuesto activo contenido en dichas composiciones es muy dependiente de la naturaleza específica de éste, así como también de la actividad del compuesto y de las necesidades del sujeto.

Los inyectables son diseñados para administración local y generalizada. Para propósitos de la presente, la administración local es deseada para administración directa al intersticio afectado. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles secos estériles, como polvos liofilizados, listos para ser combinados con un solvente justamente antes de uso, que incluyen tabletas hipodérmicas, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para ser combinados con un vehículo justamente antes de uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser ya sea

acuosas o bien no acuosas. Si se administran intravenosamente, portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina regulada con fosfato (PBS), y soluciones que contengan agentes espesantes y solubilizantes, como glucosa, polietilenglicol, y propilenglicol y mezclas de éstos.

Los portadores aceptables farmacéuticamente usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, reguladores, antioxidantes, anestésicos locales, agentes dispersantes y para suspensión, agentes emulsificantes, agentes secuestrantes o quelante y otras sustancias aceptables farmacéuticamente. Ejemplos de vehículos acuosos incluyen Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa Isotónica, Inyección de Agua Estéril, Inyección de Ringer Lacteada y Dextrosa. Vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de orígen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, y aceite de cacahuate. Pueden añadirse gentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales empacadas en contenedores de dosis múltiple, los cuales incluyen, los cuales incluyen fenoles o cresoles, mercurianos, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres

metílico y propílico del ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Reguladores incluyen fosfato y citrato. Antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Agentes de suspensión y dispersantes incluyen carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropil metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Agentes emulsificantes incluyen Polisorbato 80 (TEENs 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste de pH.

La concentración del compuesto activo farmacéuticamente es ajustada de modo que una inyección proporcione una cantidad efectiva para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, peso y condición del paciente o animal como es sabido en el arte. Las preparaciones parenterales en dosis unitaria son empacadas en una ampolleta, un frasquito o una jeringa con aguja. El volumen de solución líquida o preparación de polvo reconstituído, que contenga el compuesto activo farmacéuticamente, es una función de la enfermedad a ser

tratada y del artículo de fabricación particular seleccionado para empaque. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles; como es sabido y practicado en el arte.

En un ejemplo, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones. Si se proporciona en forma líquida, las preparaciones farmacéuticas pueden ser proporcionadas como una preparación concentrada para ser diluida a una concentración efectiva terapéuticamente antes de uso. Dichas preparaciones líquidas pueden ser preparadas por medios convencionales con aditivos aceptables farmacéuticamente como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsificantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, o aceites vegetales fraccionados); y conservadores (por ejemplo, metil o propil p-benzoatos o ácido sórbico). En otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden ser presentadas en forma liofilizada para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso.

Pueden emplearse métodos de administración para disminuir la exposición de compuestos seleccionados a

procesos degenerativos, como degradación proteolítica e intervención inmunológica vía antigénica y respuestas inmunogénicas. Ejemplos de dichos métodos incluyen administración local en el sitio de tratamiento. La PEGilación de productos terapéuticos se ha reportado que incrementa la resistencia a la proteolisis, incrementa la vida media plasmática y disminuye la antigenicidad y la inmunogenicidad. Ejemplos de metodologías de PEGilación son conocidos en el arte (véase por ejemplo, Lu y Félix, Int. J. Peptide Protein Res., 43: 127-138, 1994; Lu y Félix, Peptide Res., 6: 142-6, 1993; Félix y colaboradores, Int. J. Peptide Res., 46: 253-64, 1995; Benhar y colaboradores, J. Biol. Chem., 269:13398-404, 1994; Brumeanu y colaboradores, J. Immunol., 154: 3088-95, 1995; véase también Caliceti y colaboradores (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10):1261-77 y Molineux (2003) Pharmacotherapy 23(8 Pt 2): 3S-8S). La PEGilación también puede ser usada en la liberación de moléculas de ácido nucleico in vivo. Por ejemplo, la PEGilación de adenovirus puede incrementar la estabilidad y la transferencia genética (véase, por ejemplo, Cheng y colaboradores (2003) Pharm. Res. 20(9): 1444-51).

Polvos Liofilizados

Son de interés en la presente los polvos liofilizados, los cuales pueden ser reconstituidos para

administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. Pueden también ser reconstituidos y formulados como sólidos o geles.

El polvo liofilizado, estéril, es preparado disolviendo un compuesto activo en una solución reguladora. La solución reguladora puede contener un excipiente, el cual mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituída, preparada a partir del polvo. La filtración estéril subsecuente de la solución seguida por liofilización bajo condiciones estándares conocidas por los expertos en el arte proporciona la formulación deseada. Resumiendo, el polvo liofilizado es preparado disolviendo un excipiente, como dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, en un regulador adecuado, como citrato de sodio o fosfato de potasio u otro regulador diferente conocido por los expertos en el arte. Luego, se añade una enzima seleccionada a la mezcla resultante, y se agita hasta que disuelva. La mezcla resultante es filtrada en medio estéril o tratada para remover partículas y asegurar la esterilidad, y se distribuye en frasquitos para liofilización. Cada frasquito contiene una dosificación individual o dosificaciones múltiples del compuesto. El polvo liofilizado puede ser almacenado bajo condiciones apropiadas, como a

aproximadamente 4 °C a temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con una solución reguladora proporciona una formulación para uso en administración parenteral.

2.Dosificación y Administración

La hialuronidasa soluble proporcionada en la presente puede ser formulada como composiciones farmacéuticas, típicamente para administración en dosificación individual, en combinación con la IG. La hialuronidasa soluble seleccionada es incluida en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil de la IG en la ausencia de efectos secundarios indeseables sobre el paciente tratado. La concentración terapéuticamente efectiva puede ser determinada empíricamente probando los polipéptidos en sistemas in vitro e in vivo conocidos como por medio del uso de ensayos proporcionados en la presente o conocidos en el arte (véase por ejemplo, Taliani y colaboradores (1996) Anal. Biochem., 240: 60-67; Filocamo y colaboradores (1997) J. Virology, 71:1417-1427; Sudo y colaboradores (1996) Antiviral Res. 32: 9-18; Buffard y colaboradores (1995) Virology, 209: 52-59; Bianchi y colaboradores (1996) Anal. Biochem., 237: 239-244; Hamatake y colaboradores (1996) Intervirology 39: 249-258; Steinkuhler y colaboradores (1998) Biochem., 37:8899-8905; D'Souza y

colaboradores (1995) J. Gen. Virol., 76: 1729-1736; Takeshita y colaboradores (1997) Anal. Biochem., 247: 242-246; véase también por ejemplo Shimizu y colaboradores (1994) J. Virol. 68:8406-8408; Mizutani y colaboradores (1996) J. Virol. 70: 7219-7223; Mizutani y colaboradores (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 227: 822-826; Lu y colaboradores (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 93:1412-1417; Hahm y colaboradores, (1996) Virology, 226: 318_326; Ito y colaboradores (1996) J. Gen. Virol., 77: 1043-1054; Mizutani y colaboradores (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun, 212: 906-911; Cho y colaboradores (1997) J. Virol. Meth. 65:201-207 y luego extrapolados a partir de éstos para dosificación a humanos.

Típicamente, una dosis efectiva terapéuticamente es a o aproximadamente 500 Unidades a 100,000 Unidades de una hialuronidasa soluble. Por ejemplo, hialuronidasa soluble puede ser administrada subcutáneamente a o aproximadamente 500 unidades, 1,000 Unidades, 2,000 Unidades, 5,000 Unidades, 10,000 Unidades, 30,000 Unidades, 40,000 Unidades, 50,000 Unidades, 60,000 Unidades, 70,000 Unidades, 80,000 Unidades, 90,000 Unidades, 100,000 Unidades o más. En algunos ejemplos, pueden proporcionarse dosificaciones como una proporción de la IG administrada. Por ejemplo, la hialuronidasa puede ser administrada a 10 U/g a 500 U/g o más de IG, por ejemplo a o aproximadamente 10 U/g, 20 U/g, 30 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60

U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 200 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g o más. Típicamente, volúmenes de inyecciones o infusiones de hialuronidasa contemplados en la presente son desde o aproximadamente 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL o más. La hialuronidasa puede ser proporcionada como una solución madre a o aproximadamente 50 U/mL, 100 U(mL, 150 U/mL, 200 U/mL, 400 U/mL o 500 U/mL o puede ser proporcionada en una forma más concentrada, por ejemplo a o aproximadamente 1,000 U/mL, 1,500 U/mL, 2,000 U/mL, 4,000 U/mL o 5,000 U/mL para uso directamente o para dilución a la concentración efectiva antes de uso. La hialuronidasa soluble puede ser proporcionada como una formulación líquida o liofilizada. Formulaciones liofilizadas son ideales para almacenamiento de grandes dosis de Unidades de hialuronidasa soluble.

Las preparaciones de inmunoglobulina proporcionadas en la presente pueden ser formuladas como composiciones farmacéuticas para uso en dosificación individual o múltiple. Generalmente, las preparaciones de IG son formuladas en composición farmacéuticas para lograr regímenes de dosificación (dosis y frecuencias) para las cuales son preparadas las preparaciones intravenosas (IVIG) corrientes y administradas para enfermedades o condiciones tratables por

IG particulares. Un experto en el arte está familiarizado con regímenes de dosificación para administración IVIG de enfermedades o condiciones particulares. Por ejemplo, la sección H posterior proporciona regímenes de dosificación ejemplares (dosis y frecuencias) de IG para enfermedades y condiciones particulares. Otros regímenes de dosificación son bien conocidos por los expertos en el arte. En algunos ejemplos, la frecuencia de dosificación puede ser diaria durante un intervalo de tiempo dado durante días consecutivos o alternados, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días. En otros ejemplos, el régimen de dosificación es semanalmente, por ejemplo, una vez cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas o más. Típicamente, preparaciones de inmunoglobulina son formuladas para administración en dosis individual en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis de una vez mensualmente, pero puede ser proporcionada en cantidades menores para administraciones en dosificación múltiple. Por ejemplo, dosis de una vez mensualmente de preparaciones de IG pueden ser administradas diariamente, semanalmente, bisemanalmente o una vez al mes. Regímenes de dosificación pueden ser continuos por meses o años. Las preparaciones de IG pueden ser proporcionadas en forma líquida o liofilizada como se discutió en otra parte de

la presente.

La inmunoglobulina es proporcionada en una dosis efectiva terapéuticamente. La concentración efectiva terapéuticamente puede ser determinada empíricamente probando los compuestos en sistemas in vitro e in vivo conocidos, como los ensayos proporcionados en la presente. La concentración de una inmunoglobulina seleccionada en la composición depende de la absorción, inactivación y velocidades de excreción del complejo, las características fisicoquímicas del complejo, el programa de dosificación, y cantidad administrada así como también otros factores conocidos por el experto en el arte. Por ejemplo, se comprende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función del tejido que es tratado y puede ser determinada empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación a partir de datos de prueba in vivo o in vitro. Se hace notar que los valores de las concentraciones y de la dosificación pueden también variar con la edad del individuo tratado. Adicionalmente, se comprende que para cualquier sujeto particular, regímenes de dosificación específicos deberán ser ajustados con el tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o que supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración

expuestos en la presente son solamente ejemplares y no están previstos para limitar el alcance de ésta. La cantidad de una preparación de inmunoglobulina seleccionada a ser administrada para el tratamiento de una enfermedad o condición, por ejemplo una enfermedad o condición tratable con IG, puede ser determinada por medio de técnicas clínicas estándares. Además, ensayos in vitro y modelos animales pueden ser empleados para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos.

Por consiguiente, la dosificación precisa, la cual puede ser determinada empíricamente, puede depender de la preparación de inmunoglobulina particular, el régimen y el programa de dosificación con la hialuronidasa soluble, la ruta de administración, el tipo de enfermedad a ser tratada y la seriedad de la enfermedad. Generalmente, las preparaciones de IG tienen una concentración de proteína que es o es de aproximadamente 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de composición de IG, como, por ejemplo, 10 % en peso/volumen. Por ejemplo, IG es proporcionada en una cantidad que permita la administración subcutánea de una dosis equivalente a una dosis IV de una vez mensualmente para la indicación particular que es tratada. La dosis IV una vez mensualmente particular es una función de la enfermedad a ser tratada, y

así puede variar. Intervalos de dosificación ejemplares para administración subcutánea de IG son desde a o aproximadamente 1 gramo (g), 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g, o 200 g. La dosificación particular y las formulaciones de ésta dependen de la indicación y del individuo. Por ejemplo, pueden administrarse dosificaciones a 50 mg/kg de peso corporal (PC), 100 mg/kg de PC, 200 mg/kg de PC, 300 mg/kg de PC, 400 mg/kg de PC, 500 mg/kg de PC, 600 mg/kg de PC, o más. Si es necesario la dosificación puede determinarse empíricamente. Para lograr dichas dosificaciones, volúmenes de preparaciones de IG administrados subcutáneamente pueden ser a o aproximadamente 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL o más. Por ejemplo, una formulación líquida de IG al 10 % (100 mg/mL) para indicaciones descritas en la presente, puede ser administrada en un volumen de 50 mL a 700 mL para lograr una dosificación de 0.5 g a 70 g de IG.

Cuando son administrados grandes volúmenes, la administración es típicamente por infusión. Los sujetos pueden ser dosificados a velocidades de infusión a o aproximadamente 0.5 mL/kg de PC/h, 1 mL/kg de PC/h, 2 mL/kg de PC/h, 3 mL/kg de PC/h, 4 mL/kg de PC/h, o 5 mL/kg de PC/h. La velocidad de infusión puede ser determinada empíricamente, y típicamente es una función de la tolerancia del sujeto. Si

tiene lugar una reacción adversa durante la infusión, la velocidad de infusión puede bajarse a la velocidad inmediatamente inferior a la cual tuvo lugar el evento adverso. Si el evento adverso se resuelve en respuesta a la reducción en la velocidad, la velocidad de infusión puede ser incrementada lentamente a discreción del médico. Las infusiones de IG subcutáneas pueden ser facilitadas por la gravedad, infusión por bombeo o inyección de una dosis total de 20 a 30 gramos. Generalmente, para infusión intravenosa, pueden emplearse las bombas de infusión. IG puede ser infusionada a velocidades a o de aproximadamente 5 mL/h, 10 mL/h, 30 mL/h, 60 mL/h, 120 mL/h, 240 mL/h o 300 mL/h. Las velocidades de infusión pueden ser incrementadas durante el transcurso del tratamiento siempre que la infusión sea tolerada por el paciente. Generalmente, el tiempo de administración de la infusión es a o de aproximadamente 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h, 4 h o más. Debido a la alta velocidad de infusión lograda por administración subcutánea de IG coformulada y/o coadministrada con hialuronidasa, el tiempo de infusión es significativamente menos que para las terapias IVIG convencionales. Cuando el tiempo de infusión excede el límite deseado, puede iniciarse un segundo sitio de infusión a discreción del sujeto y del médico. El segundo sitio típicamente es iniciado al menos 10 cm del sitio

inicial.

Las técnicas para infusión son conocidas por un experto en el arte, y está en la experiencia de un médico tratante. Generalmente, la dosis apropiada de IG puede ser conjuntada en una bolsa de IV estándar. Por ejemplo, puede usarse un equipo para infusión sin venteo que tenga un puerto en "Y" cerca de su terminus. Puede insertarse una aguja para infusión subcutánea calibre 24 en un sitio de la preferencia del sujeto, pero el abdomen y en segundo término los muslos son recomendados por el volumen de solución a ser infusionado. La hialuronidasa y la IG pueden ser proporcionadas en el mismo equipo de puerto en "Y". También pueden usarse en la presente otros artículos de fabricación para propósitos de infusión por gravedad o una bomba, e incluyen pero no se limitan a tubos, botellas, jeringas u otros contenedores.

La hialuronidasa soluble puede ser administrada subsecuente, intermitente o simultáneamente de la preparación de IG. Generalmente, la hialuronidasa es administrada antes de la administración de la preparación de IG para permitir a la hialuronidasa degradar el ácido hialurónico en el espacio intersticial. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede ser administrada 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10

minutos, 20 minutos, o 30 minutos antes de la administración de la preparación de IG. En algunos ejemplos, la hialuronidasa es administrad ajunto con la preparación de inmunoglobulina. Como apreciarán los expertos en el arte, al proximidad deseada de co-administración depende en parte significativa de la vida media efectiva de los agentes en el tejido particular involucrado, y de la enfermedad particular que es tratada, y puede ser optimizada fácilmente probando los efectos de administrar los agentes a tiempos variables en modelos adecuados, como en modelos animales adecuados. En algunas situaciones, el tiempo óptimo de administración de la hialuronidasa excederá de 60 minutos.

Generalmente, antes de infusión de IG, es inyectada una hialuronidasa soluble a una velocidad de o de aproximadamente 0.2 mL/min, 0.5 mL/min, 1 mL/min, 2 mL/min, 5 mL/min, 10 mL/min o más. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede ser inyectada a través del mismo puerto en "Y" usado para infusión subsecuente de IG. Como se indicó anteriormente, el volumen de hialuronidasa soluble administrada es una función de la dosificación requerida, pero puede variar dependiendo de la concentración de una formulación madre de hialuronidasa soluble disponible. Por ejemplo, se contempló en la presente que la hialuronidasa soluble no sea administrada en volúmenes mayores que

aproximadamente 50 mL, y típicamente es administrada en un volumen de 5 - 30 mL. Puede usarse una bomba de jeringa para los volúmenes mayores, a discreción del médico.

En el caso en el que una infusión no sea tolerada (por ejemplo, cause reacciones locales moderadas a severas), puede iniciarse un segundo sitio de infusión de modo que el sujeto reciba la dosificación total.

Una preparación de IG puede ser administrada en una vez, o puede ser dividida en un número de dosis más pequeñas a ser administradas a intervalos de tiempo. Las preparaciones de Ig seleccionadas pueden ser administradas en una o más dosis durante el transcurso de un tiempo de tratamiento, por ejemplo, durante varias horas, días, semanas, o meses. En algunos casos, es útil la administración continua. Se entiende que la dosificación precisa y el curso de administración depende de la indicación y tolerancia del paciente.

También, se comprende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función de la enfermedad que es tratada y pueden ser determinados empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación de datos de pruebas in vivo e in vitro. Se hace notar que los valores de concentraciones y dosificaciones también pueden variar con la severidad de la condición a ser aliviada. Adicionalmente,

se comprende que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberán ser ajustados con el tiempo de conformidad con la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o que supervisa la administración de las composiciones, y que las variaciones de concentración expuestas en la presente son ejemplares solamente y no están previstas para limitar el alcance o uso de composiciones y combinaciones que las contienen. Las composiciones pueden ser administradas horaria, diaria, semanal, mensualmente o una vez. Generalmente, regímenes de dosificación son seleccionados para limitar la toxicidad. Se debe hacer notar que el médico que atiende deberá saber cómo y cuando terminar, interrumpir o ajustar la terapia a dosificación más baja debido a la toxicidad, o disfunciones de la médula ósea, de hígado o de riñón o de otro tejido. Contrariamente, el médico que atiende también debe saber cómo y cuando ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada (previniendo efectos tóxicos secundarios).

G.Métodos de Evaluar la Actividad, Biodisponibilidad y Farmacocinética

Pueden usarse ensayos para evaluar las actividades in vivo e in vitro de inmunoglobulina sola o en combinación con una hialuronidasa soluble. Entre dichos ensayos se

incluyen aquellos que evalúan las propiedades farmacocinéticas de inmunoglobulina administrada subcutáneamente, que incluyen la biodisponibilidad y la tolerancia. La actividad biológica de ambas, inmunoglobulina y hialuronidasa soluble también puede ser evaluada usando ensayos bien conocidos en el arte. Dichos ensayos pueden ser usados, por ejemplo, para determinar dosificaciones apropiadas de inmunoglobulina y hialuronidasa, y la frecuencia de dosificación, para tratamiento.

1.Farmacocinética y Tolerancia

Los estudios farmacocinéticos y de tolerancia , como los descritos en el Ejemplo 1 posterior, pueden ser efectuados usando modelos animales o pueden ser efectuados durante estudios clínicos con pacientes. Los modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, cobayos y modelos primates no humanos, como los monos cinomolgus o los macacos rhesus. En algunos casos, los estudios farmacocinéticos y de tolerancia son efectuados usando animales saludables. En otros ejemplos, los estudios son efectuados usando modelos animales de una enfermedad para la cual es considerada la terapia con inmunoglobulina, como modelos animales de cualquiera de las enfermedades y condiciones descritas posteriormente.

La farmacocinética de la inmunoglobulina

administrada subcutáneamente puede ser evaluada midiendo dichos parámetros como la concentración plasmática máxima (pico) de inmunoglobulina (C_{max}), el tiempo pico, (es decir, cuando tiene lugar la concentración plasmática máxima de inmunoglobulina (T_{max})), la concentración plasmática mínima de inmunoglobulina (es decir la concentración plasmática mínima entre dosis de inmunoglobulina; C_{min}), la vida media de eliminación (T1/2) y el área bajo la curva (es decir, el área bajo la curva generada por graficación del tiempo contra la concentración plasmática de inmunoglobulina; AUC), después de administración. La biodisponibilidad absoluta de inmunoglobulina administrada subcutáneamente es determinada comparando el área bajo la curva de inmunoglobulina después de liberación subcutánea (AUC_{sc}) con el AUC de inmunoglobulina después de liberación intravenosa (AUC_{iv}). La biodisponibilidad absoluta (F), puede ser calculada usando la fórmula $F = ([AUC]_{sc} \times dosis_{sc})/ ([AUC]_{iv} \times dosis_{iv})$. La concentración de inmunoglobulina en el plasma después de administración subcutánea puede ser medida usando cualquier método conocido en el arte adecuado para evaluar concentraciones de inmunoglobulina en muestras de sangre. Métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ELISA y nefelometría.

Un intervalo de dosis y diferente frecuencia de

dosificación de dosificaciones pueden ser administradas en los estudios farmacocinéticos para evaluar el efecto de disminuir o aumentar las concentraciones de inmunoglobulina y/o de hialuronidasa en la dosis. Las propiedades farmacocinéticas de inmunoglobulina administrada subcutáneamente, como biodisponibilidad, también pueden ser evaluadas con o sin co-administración de hialuronidasa. Por ejemplo, a perros como sabuesos, se les puede administrar inmunoglobulina subcutáneamente en combinación con hialuronidasa, o sola. También se dieron dosis intravenosas de inmunoglobulina a otro grupo de sabuesos. Pueden entonces tomarse muestras de sangre a varios tiempos puntuales y determinar la cantidad de inmunoglobulina en el plasma, como por nefelometría. Puede entonces medirse el AUC y puede determinarse la biodisponibilidad de inmunoglobulina administrada subcutáneamente, administrada con o sin hialuronidasa. Dichos estudios pueden ser efectuados para evaluar el efecto de la co-administración con hialuronidasa sobre las propiedades farmacocinéticas, como la biodisponibilidad, de inmunoglobulina administrada subcutáneamente.

Los estudios para evaluar la seguridad y la tolerancia también son conocidos en el arte y pueden ser usados en la presente. Después de administración subcutánea

de inmunoglobulina con o sin co-administración de hialuronidasa, puede monitorearse el desarrollo de cualquiera de las reacciones adversas. Las reacciones adversas pueden incluir, pero no limitarse a, reacciones en el sitio de inyección, como edema o hinchazón, jaqueca, fiebre, fatiga, escalofríos, bochornos, vértigo, urticaria, respiración ruidosa u opresión torácica náuseas, vómitos, rigor, dolor de espalda, dolor de pecho, calambres musculares, accesos o convulsiones, cambios en la presión sanguínea y respuestas anafilácticas o de hipersensibilidad severa. Típicamente, un intervalo de dosis y diferentes frecuencias de dosificación son administradas en los estudios de seguridad y tolerancia para evaluar el efecto de aumentar o disminuir las concentraciones de inmunoglobulina y/o de hialuronidasa en la dosis.

2.Actividad Biológica

a.Inmunoglobulina

La habilidad de inmunoglobulina para actuar como un agente terapéutico puede ser evaluada in vitro o in vivo. Por ejemplo, pueden efectuarse ensayos in vivo para evaluar la habilidad de inmunoglobulina para neutralizar la infectividad viral o bacteriana (Hiemstra y colaboradores, (1994) J Lab Clin Med 123:241-6). Otros ensayos in vitro pueden ser utilizados para evaluar otras actividades biológicas de

inmunoglobulina. Por ejemplo, la habilidad de preparaciones de inmunoglobulina para interactuar con y modular productos de activación de complemento, enlazar anticuerpos idiotípicos, enlazar a receptores de Fc sobre macrófagos, y suprimir varios mediadores inflamatorios incluyendo citoquinas, quimioquinas, y metaloproteinasas, pueden ser expresados usando cualquier método conocido en el arte, incluyendo, pero no limitándose a ELISA, tinción Western, tinción Northern y citometría de flujo para evaluar la expresión del marcador. Por ejemplo, el efecto de inmunoglobulina sobre la expresión de receptores de quimioquina sobre células mononucleares de sangre periférica puede ser evaluada usando citometría de flujo (Trebs y colaboradores (2006) Eur J Neurology). En otro ejemplo, el efecto de inmunoglobulina sobre la expresión de metaloproteínasa en macrófagos puede ser evaluada usando análisis por tinción Northern (Shapiro y colaboradores (2002) Cancer 95:2032-2037).

También pueden ser efectuados estudios in vivo usando modelos animales para evaluar la actividad terapéutica de inmunoglobulina. La inmunoglobulina puede ser administrada a modelos animales infectados con uno o más microorganismos y pueden evaluarse el efecto sobre el progreso de la infección, como midiendo el número de microorganismos o midiendo el peso

como un marcador de morbilidad. El efecto terapéutico de inmunoglobulina también puede ser evaluado usando modelos animales de las enfermedades y condiciones para las cuales se considera la terapia usando inmunoglobulina. Dichos modelos animales son conocidos en el arte, e incluyen, pero no se limitan a, modelos de animales pequeños para agamaglobulinemia congénita o ligada al cromosoma X (XLA), SCID, síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Guillain-Barré, ITP, poliomiositis, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, Miastenia gravis y síndrome de Moersch-Woltmann (Czitrom y colaboradores (1985) J immunol 134:2276-2280, Ellmeier y colaboradores, (2000) J Exp Med 192:1611-1624, Ohno (2006) Drug Discovery Today: Disease Models 3:83-89, Oyaizy y colaboradores (1988) J Exp Med 2017-2022, Hansen y colaboradores, (2002) Blood 100:2087-2093, Strongwater y colaboradores, (1984) Arthritis Rheum. 27:433-42, Kim y colaboradores (1998) Annals NY Acad Sci 841:670-676, Christadoss y colaboradores (2000) 94:7-87, Sommer y colaboradores, (2005) Lancet 365:1406-1411, Patente U.S. No. 7309810).

b.Hialuronidasa

La actividad hialuronidasa puede ser evaluada usando métodos bien conocidos en el arte. En un ejemplo, la actividad es medida usando un ensayo de microturbidez. Este,

está basado en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se enlaza con albúmina de suero. La actividad es medida por incubación de hialuronidasa con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) Por un período de tiempo (por ejemplo 10 minutos) y luego precipitando el hialuronato de sodio sin digerir con la adición de albúmina de suero acidificada. La turbidez de la muestra resultante es medida a 640 nm después de un período de desarrollo adicional. La disminución en turbidez que resulta de la actividad hialuronidasa sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática de la hialuronidasa. En otro ejemplo, la actividad hialuronidasa es medida usando un ensayo de microtítulo en el cual el ácido hialurónico biotinilado residual es medido después de incubación con hialuronidasa (véase por ejemplo, Frost y Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, Publicación de Patente U.S. No 2005/0260186). Los grupos carboxilo libres sobre los residuos de ácido glucurónico de ácido hialurónico son biotinilados, y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado es acoplado covalentemente a una placa de microtítulo. Después de incubación con hialuronidasa, el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual es detectado usando una reacción de avidina-peroxidasa, y es comparado con el obtenido después de reacción con estándares

de hialuronidasa de actividad conocida. También son conocidos en el arte otros ensayos para medir la actividad hialuronidasa y pueden ser usados en los métodos de la presente (véase por ejemplo Delpech y colaboradores, (1995) Anal. Biochem. 229:35-41; Takahashi y colaboradores, (2003) Anal. Biochem. 322:257-263).

La habilidad de hialuronidasa para actuar como un agente diseminador o difusor también puede ser evaluada. Por ejemplo, el colorante azul de triptano puede ser inyectado subcutáneamente con o sin hialuronidasa en la piel lateral sobre cada lado de ratón desnudo. El área colorada es entonces medida, como con un calibre micrométrico, para determinar la habilidad de hialuronidasa para actuar como un agente diseminador (Patente U.S. No. 206/0104968).

H. Usos Terapéuticos

Los métodos descritos en la presente pueden ser usados para tratamiento de cualquier condición para la cual sea empleada inmunoglobulina. La inmunoglobulina (IG) puede ser administrada subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa, para tratar cualquier condición que sea corregible con tratamiento con inmunoglobulina. Esta sección proporciona usos terapéuticos ejemplares de IG. Los usos terapéuticos descritos posteriormente son ejemplares y no limitan las aplicaciones de los métodos descritos en la

presente. Los usos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, terapia de reemplazo de inmunoglobulina y terapia de inmunomodulación para varias condiciones y enfermedades inmunológicas, hematológicas, neurológicas, inflamatorias, dermatológicas y/o infecciosas. En algunos ejemplos, la inmunoglobulina es administrada para aumentar la respuesta inmune en pacientes saludables, como después de posible exposición a enfermedades infecciosas (por ejemplo, daño por pinchazo accidental con aguja). Está en la experiencia de un médico tratante identificar dichas enfermedades o condiciones.

La inmunoglobulina puede ser co-administrada subcutáneamente con hialuronidasa, en combinación con otros agentes usados en el tratamiento de estas enfermedades y condiciones. Por ejemplo, otros agentes que pueden ser administrados incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, quimioterapéuticos, anti-inflamatorios esteroidales, anti-inflamatorios no esteroidales, y otros agentes inmunomoduladores como citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento.

Si es necesario, puede ser determinado empíricamente o extrapolado un protocolo de dosificación particular y duración de tratamiento. Por ejemplo, dosis ejemplares de inmunoglobulina administrada intravenosamente

pueden ser usadas como un punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas. Los niveles de dosificación pueden ser determinados con base en una variedad de factores, como peso corporal del individuo, salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la severidad y el curso de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el juicio del médico tratante. Generalmente, las dosificaciones de inmunoglobulina son desde o aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal (es decir, 100 mg/kg de PC) a 2 g/kg de PC, y las dosificaciones de hialuronidasa son desde o aproximadamente 100 U/gramo a 500 U/g o más de inmunoglobulina, por ejemplo, a o aproximadamente 10 U/g, 20 U/g, 30 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 200 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g o más. Se comprende que la cantidad a administrar será una función de la indicación tratada, y posiblemente los efectos secundarios serán tolerados. Las dosificaciones pueden ser determinada empíricamente usando modelos reconocidos para cada trastorno.

Después de mejoramiento de una condición de un paciente, una dosis de inmunoglobulina de mantenimiento puede ser administrada subcutáneamente en combinación con hialuronidasa, si es necesario, y la dosificación, la forma

de dosificación, o la frecuencia de administración, o una combinación de éstas pueden ser modificadas. En algunos casos, un sujeto puede requerir tratamiento intermitente con una base a largo plazo después de cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

1.Inmunodeficiencia Primaria con Deficiencia de Anticuerpos

La inmunoglobulina puede ser usad apara tratar inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos. La inmunodeficiencia primaria abarca muchos trastornos que están caracterizados por una deficiencia de una o más proteínas del sistema inmune. Típicamente, las inmunodeficiencias primarias son trastornos heredados, y muchos se manifiestan por falla en la producción del anticuerpo protector. Por consiguiente, la inmunoglobulina puede ser administrada como terapia de reemplazo de inmunoglobulina para pacientes que se presentan con dichas enfermedades. Ejemplares de inmunodeficiencias primarias incluyen, pero no se limitan a, inmunodeficiencia variable común (CVID) agamaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia severa combinada (SCID), hipogamaglobulinemia primaria, enfermedades por inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agamaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), hipogamaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebelar

paraneoplástica sin anticuerpos. La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa, a pacientes con inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos a dosis similares a las dosis usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina. Las dosis ejemplares incluyen, por ejemplo, entre 100 mg/kg de PC y 800 mg/kg de PC de inmunoglobulina, a intervalos de cuatro semanas. La dosis puede ser incrementada o disminuida, según la frecuencia de las dosis, dependiendo de la respuesta clínica.

2.Hipogamaglobulinemia Secundaria Adquirida en Malignidades Hematológicas

Pacientes con hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas, como leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), linfoma no de Hodgkin (NHL) y otras malignidades relevantes y post-trasplante de células embrionarias hematopoyéticas, son susceptibles a infecciones bacterianas debido a. La hipogamaglobulinemia es causada por una falta de linfocitos B y a un bajo nivel de anticuerpos en la sangre resultante, y puede ocurrir en pacientes con CLL, MM, NHL y como un resultado tanto de disfunción inmune relacionada con leucemia como a inmunosupresión relacionada con terapia. La deficiencia en la inmunidad humoral es ampliamente

responsable por el riesgo creciente de morbilidad y mortalidad relacionada con infección en estos pacientes, especialmente por microorganismos encapsulados. Por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, y Staphylococcus aureus*, así como también *Legionella y Nocardia spp.* son patógenos bacterianos frecuentes que causan pneumonía en pacientes con CLL. También han sido observadas infecciones oportunistas como *Pneumocystitis carinii*, hongos, virus, y micobacterias. El número y severidad de infecciones en estos pacientes puede ser reducido significativamente por administración de inmunoglobulina (Griffiths y colaboradores, (1989) Blood 73:366-368, Chapel y colaboradores (1994) Lancet 343:1059-1063). Por consiguiente a dichos pacientes se les puede administrar inmunoglobulina subcutáneamente en combinación con hialuronidasa usando los métodos descritos en la presente para prevenir infecciones recurrentes. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas. Por ejemplo, aproximadamente 400 mg/kg de PC de inmunoglobulina, en combinación con hialuronidasa, pueden ser administrados subcutáneamente cada 3 a 4 semanas. En un ejemplo adicional, una dosis adicional de 400 mg/kg de PC pueden ser administrados en el primer mes de terapia cuando

la inmunoglobulina del suero del paciente sea inferior a 4 g/litro. La cantidad de inmunoglobulina administrada, y la frecuencia de las dosis, puede ser incrementada o disminuida según sea apropiado.

3.Enfermedad de Kawasaki

La enfermedad de Kawasaki es una enfermedad multi-sistema, febril, aguda de niños y jóvenes que involucra a menudo las arterias coronarias. Es también conocida como síndrome de los ganglios linfáticos, poliarteritis infantil y síndrome de Kawasaki, y es una vasculitis auto-limitada pobremente comprendida que afecta a muchos órganos, incluyendo la piel y membranas mucosas, ganglios linfáticos, paredes de vasos sanguíneos, y el corazón. Puede tener lugar aneurisma de arterias coronarias desde la segunda semana de enfermedad durante la etapa de convalecencia. Aunque la causa de la condición es desconocida, hay evidencia de que las vasculitis característica resulta de una reacción inmune caracterizada por la activación de células T y macrófagos a un antígeno desconocido, secreción de citoquinas, hiperactividad de células B policlonales, y la formación de auto-anticuerpos en células endoteliales y células de músculo liso. En individuos susceptibles genéticamente, uno o más agentes infecciosos comunes no caracterizados , posiblemente con actividad super-antigénica, pueden activar la enfermedad.

La inmunoglobulina administrada previamente en la enfermedad de Kawasaki puede prevenir la patología de la arteria coronaria. La administración subcutánea de inmunoglobulina en combinación con hialuronidasa a pacientes con inflamación en curso asociada con la enfermedad de Kawasaki pueden mejorar los síntomas. Dosificaciones ejemplares incluyen aquellas usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con enfermedad de Kawasaki. Por ejemplo, a un paciente con enfermedad de Kawasaki se le puede administrar aproximadamente 1 - 2 g de inmunoglobulina por kg de peso corporal del paciente. Esta puede ser administrada, por ejemplo, en cuatro dosis de 400 mg/kg de PC por cuatro días consecutivos. En otro ejemplo, 1 g de inmunoglobulina/kg de PC es administrado como una dosis única durante un período de 10 horas. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser incrementada o disminuída según sea apropiado.

4.Polineuropatía Desmielinante Inflamatoria Crónica

La polineuropatía desmielinante inflamatoria crónica (CIDP) es un trastorno neurológico caracterizado por debilidad progresiva y deterioro de la función sensorial en las piernas y brazos. El trastorno, el cual algunas veces es llamada neuropatía recurrente crónica, es causada por daño a la envolvente de mielina de los nervios periféricos. Aunque puede ocurrir a cualquier edad y en ambos géneros, CIDP es

más común en jóvenes adultos y en hombres más que en mujeres. A menudo se presenta con síntomas que incluyen comezón o adormecimiento (que comienza en los dedos de los pies y dedos), debilidad de los brazos y piernas, pérdida de reflejos del tendón profundo (areflexia), fatiga, y sensaciones anormales, CIDP está estrechamente relacionada al síndrome de Guillain-Barre y es considerada la contraparte crónica de esa enfermedad aguda. No hay prueba de diagnóstico específica pro descubrimientos de laboratorio y clínicos característicos ayudan a distinguir este trastorno de otros síndromes neuropáticos inmunomediados. Los estudios indican que el tratamiento con inmunoglobulina reduce los síntomas (van Schaik y colaboradores, (2002) Lancet Neurol. 1: 497-498). Por consiguiente, la inmunoglobulina puede ser co-administrada con hialuronidasa subcutáneamente a pacientes que se presentan con CIDP usando los métodos descritos en la presente. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con CIDP. En un ejemplo, a un paciente con CIDP se le administró aproximadamente 2 g/kg de PC de inmunoglobulina subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa. Esta puede ser administrada, por ejemplo, en cinco dosis de 400 mg/kg de PC por cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser aumentada o disminuída

según sea apropiado.

5.Síndrome de Guillain-Barré

El síndrome de Guillain-Barré es un trastorno autoinmune neurológico que involucra desmielinación inflamatoria de nervios periféricos. Los primeros síntomas incluyen grados variables de debilidad o sensaciones de comezón en las piernas, las cuales pueden extenderse a los brazos y parte superior del cuerpo. Estos síntomas pueden disminuir en intensidad hasta que los músculos no pueden ser usados totalmente y el paciente está casi totalmente paralizado, dando como resultado una condición amenazante de vida. Aunque la recuperación es generalmente buena o completa en la mayoría de pacientes, se ha reportado que tiene lugar una incapacidad persistente en aproximadamente 20 % y muerte en 4 a 15 % de pacientes. El síndrome de Guillain-Barré puede tener lugar unos cuantos días o semanas después de los síntomas de infección viral respiratoria o gastrointestinal. En algunos casos la cirugía o la vacunación pueden activar el síndrome. El trastorno se puede desarrollar durante el transcurso de horas o días, o puede tomar 3 a 4 semanas. Un aprueba de velocidad de conducción del nervio (NCV) puede dar una pista al doctor para ayudar al diagnóstico. En algunos casos, una punción espinal puede ser usada para diagnóstico ya que el fluido cerebroespinal en pacientes on síndrome de

Guillain-Barré típicamente contiene más proteínas que en sujetos normales.

Aunque no hay cura conocida para el síndrome de Guillain-Barré, el tratamiento con inmunoglobulina puede aminorar la severidad de la enfermedad y acelerar la recuperación. La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente a pacientes en combinación con hialuronidasa a una dosis apropiada, como, por ejemplo, una dosis similar a la dosis usada para administrar inmunoglobulina intravenosamente a pacientes con el síndrome de Guillan-Barré. Por ejemplo, a un paciente con el síndrome de Guillain-Barré se le puede administrar aproximadamente 2 g/kg de PC de inmunoglobulina, en combinación con hialuronidasa, subcutáneamente. Esta puede ser administrada, por ejemplo, en cinco dosis de 400 mg/kg de PC por cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser aumentada o disminuída dependiendo de, por ejemplo, la severidad de la enfermedad y la respuesta clínica a la terapia, la cual puede ser evaluada fácilmente por un experto en el arte.

6.Púrpura Trombocitopénica Idiopática

La Púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) también conocida como púrpura trombocitopénica inmune primaria y púrpura trombocitopénica autoinmune, es una

reducción en la cuenta plaquetaria (trombocitopenia) resultante de la supervivencia plaquetaria acortada debido a anticuerpos anti-plaquetas. Cuando las cuentas plaquetarias son muy bajas (por ejemplo < 30 x 10^9/L) puede tener lugar el sangrado en la piel (púrpura) y membranas mucosas. La producción de plaquetas en la médula ósea (megakariopoyesis) en pacientes con ITP es morfológicamente normal. En algunos casos, hay deterioro adicional de la función plaquetaria relacionada con el enlace del anticuerpo a glicoproteínas sobre la superficie plaquetaria. La ITP puede estar presente como formas agudas y crónicas. Aproximadamente 80 % de adultos con ITP tienen la forma crónica de la enfermedad. La máxima incidencia de ITP crónica es en mujeres de 15 a 50 años de edad, aunque algunos reportes sugieren que la incidencia es creciente con la edad. La ITP es relativamente común en pacientes con VIH. Aunque la ITP puede encontrarse en cualquier etapa de la infección, su importancia aumenta cuando la enfermedad de VIH avanza.

Los estudios han demostrado que la inmunoglobulina puede ser usada para tratar a pacientes con ITP (Godeau y colaboradores (1993) Blood 82(5):1415-21, Godeau y colaboradores (1999) Br J Haematol 1999; 107(4):716-9). La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente a pacientes en combinación con hialuronidasa a una dosis

similar a la dosis usada para administrar inmunoglobulina intravenosamente, para tratar pacientes con ITP. Por ejemplo, a un paciente con ITP se le puede administrar aproximadamente 1 a 2 g/kg de inmunoglobulina, en combinación con hialuronidasa, subcutáneamente. Esta puede ser administrada durante varios días, o puede ser administrada en una dosis. En algunos ejemplos, cinco dosis de 400 mg/kg de PC de inmunoglobulina es administrada por 1 - 2 días consecutivos, dependiendo de la cuenta plaquetaria y de la respuesta clínica. La cantidad de inmunoglobulina administrada, y la frecuencia de las dosis, puede ser aumentada o disminuida dependiendo de, por ejemplo, la cuenta plaquetaria y lla respuesta clínica a la terapia, la cual puede ser fácilmente evaluada por un experto en el arte.

7.Miopatías Inflamatorias: Polimiositis, dermatomiositis y miositis corporal por inclusión.

Las miopatías inflamatorias son un grupo de enfermedades musculares que involucran la inflamación y la degeneración de tejidos del músculo esquelético. Estos trastornos son adquiridos y todos están presentes con significativa debilidad muscular y la presencia de una respuesta inflamatoria en el músculo. La dermatomiositis (DM) es la más fácilmente reconocida de las miopatías inflamatorias debido a su sarpullido distintivo, el cual

ocurre como un sarpullido por zonas, oscuro, rojizo o lila sobre los párpados, mejillas y el puente nasal, , y sobre la espalda o parte superior del tórax, codos, rodillas y nudillos. En algunos pacientes, ganglios calcificados o barriga endurecida se desarrolla bajo la piel. El sarpullido a menudo precede a la debilidad muscular, la cual típicamente se desarrolla durante un período de semanas pero puede desarrollarse durante meses o aún días. La dermatomiositis puede tener lugar a cualquier edad desde la niñez a la adultez y es más común en hembras que en machos. Aproximadamente un tercio de pacientes con DM reporta dificultades para tragar. Dolor y ablandamiento muscular, generalmente ocurren en menos de 25 % de adultos con DM, pero más de 50 % de niños con DM se quejan de dolor y ablandamiento muscular.

La Polimiositis no tiene el sarpullido característico de la dermatomiositis, y el principio de la debilidad muscular usualmente progresa más lento que en DM. Muchos pacientes de PM presentes tienen dificultad para tragar. En algunos casos, los pacientes también tienen dificultad para respirar debido a falla muscular. Tantos como un tercio de pacientes de PM tienen dolor muscular, PM. La enfermedad afecta a más mujeres que hombres, y raramente

afecta a gente con edad inferior a 20 años, aunque se han reportado casos de polimiositis de la infancia y de la niñez.

La miositis corporal por inclusión (IBM) es muy similar a la polimiositis. El principio de la debilidad muscular en IBM es usualmente muy gradual, teniendo lugar durante meses o años. Es diferente de PM en que ambos músculos distal y proximal son afectados mientras que generalmente solamente los músculos proximales son afectados en PM. Encuentros típicos incluyen debilidad de los flexores de la muñeca y de los flexores de los dedos. La atrofia del antebrazo es característica de la enfermedad, y atrofia del músculo cuadríceps es común con grados variables de debilidad en otros músculos. Aproximadamente la mitad de los pacientes afligidos con IBM tienen dificultad para tragar. Los síntomas de IBM usualmente comienzan después de la edad de 50 años, aunque ningún grupo de edad es excluido. La IBM tiene lugar más frecuentemente en hombres que en mujeres. Aproximadamente uno en diez casos de IBM puede ser hereditaria.

Los estudios indican que la administración de inmunoglobulina puede beneficiar a pacientes con estas miopatías inflamatorias. La inmunoglobulina puede mejorar la fortaleza muscular, reducir la inflamación y reducir el progreso y la severidad de la enfermedad (Dalakas y colaboradores (1993) N Engl J Med 329(27): 1993-2000; Dalakas

y colaboradores (2001) Neurology 56(3):323.7, Dalakas (2004) Pharmacol Ther 102(3):177-93, Walter y colaboradores (2000) J Neurol 247(1):22-8). La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente a pacientes con DM, PM o IBM en combinación con hialuronidasa a una dosis similar a la dosis usada para administra inunoglobulina intravenosamente. Por ejemplo, 2 g/kg de PC de inmunoglobulina pueden ser administrados, típicamente durante varios días, como, por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg de PC en días consecutivos.

8.Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton

El síndrome miasténico de Lambert Eaton (LEMS) es un raro trastorno inmune de transmisión neuromuscular primero reconocido clínicamente en asociación con cáncer de pulmón y subsecuentemente en casos en los cuales no se detectó ningún neoplasma. Pacientes con LEMS tienen un defecto en la articulación neuromuscular presináptica. La enfermedad está caracterizada clínicamente por debilidad del músculo proximal con aumento de la fuerza después de ejercicio, signos óculomotores ligeros, reflejos del tendón profundo disminuidos y disfunción autonómica (boca seca, constipación, falla eréctil). La administración subcutánea de inmunoglobulina en combinación con hialuronidasa a pacientes con LEMS puede mejorar los síntomas. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración

intravenosa de inmunoglobulina apacientes con LEMS. Por ejemplo, a un paciente con LEMS se le pueden administrar 2 g de inmunoglobulina por kg de peso corporal del paciente en varias dosis. Por ejemplo, cinco dosis de 400 mg de inmunoglobulina por kg de peso corporal pueden ser administradas en cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser aumentada o disminuída según sea apropiado.

9.Neuropatía Motora Multifocal

La neuropatía motora multifocal (MMN) con bloqueo de conducción es una neuropatía desmielinante inmuno mediada adquirida con debilidad progresiva lentamente, fasciculaciones, y calambres, sin implicaciones sensoriales significativas. La duración de la enfermedad antes de diagnóstico varía en intervalos de diagnóstico desde varios meses a más de 15 años. La causa precisa de MMN es desconocida. Estudios histopatológicos y de electrodiagnóstico demuestran la presencia de ambos daños, axonal y desmielinante. Los nervios motores son afectados primeramente, aunque también se ha demostrado ligera desmielinación en nervios sensoriales. La eficiencia del tratamiento inmunomodulador e inmunosupresor apoya adicionalmente la naturaleza inmune de MMN. Los títulos de anticuerpos anti-GM1 son elevados en más de la mitad de los

pacientes con MMN. Aunque el papel de los anticuerpos anti-GM1 en la enfermedad es desconocido, su presencia puede ser usada como un marcador de diagnóstico para MMN.

La administración subcutánea de inmunoglobulina en combinación con hialuronidasa a pacientes con MMN puede mejorar los síntomas. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con MMN. Por ejemplo, a un paciente con MMN se le puede administrar 2 g de inmunoglobulina por kg de peso corporal en varias dosis. Por ejemplo, cinco dosis de 400 mg de inmunoglobulina por kg de peso corporal pueden ser administrados en cinco días consecutivos. En otro ejemplo, pueden administrarse 1 g/kg de peso corporal en 2 días consecutivos. A algunos pacientes se les puede dar terapia de mantenimiento, la cual puede incluir, por ejemplo, dosis de 400 mg/kg de peso corporal a 2 g/kg de peso corporal, dados cada 2 - 6 semanas. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser aumentada o disminuida según sea apropiado tomando en cuenta la respuesta de los pacientes.

10.Miastenia Gravis

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad neuromuscular autoinmune crónica caracterizada pro grados variables de debilidad de los músculos esqueléticos del cuerpo. Esta asociada con la presencia de anticuerpos a

receptores de acetilcolina (AchR) o a tirosina quinasa específica de músculo (MuSK) en la articulación neuromuscular, aunque algunos pacientes son negativos al anticuerpo. Las características clínicas de MG incluyen debilidad fluctuante y fatigabilidad de músculos voluntarios, particularmente músculos elevadores de los párpados, extraoculares, bulbares, de los miembros y respiratorios. Los pacientes usualmente se presentan con caída de párpados unilateral o bilateral (ptosis) doble visión (diplopia), dificultad para tragar (disfagia) y debilidad del músculo proximal. La debilidad de los músculos respiratorios pueden dar como resultado falla respiratoria en casos severos o en exacerbaciones severas agudas (crisis miasténica). La miastenia gravis ocurre en todos los grupos étnicos y en ambos géneros. Más comúnmente afecta a mujeres adultas jóvenes de menos de 40 años y a hombres de edad avanzada de más de 60 años pero puede ocurrir a cualquier edad. En algunos casos, es efectuada la timectomía para reducir los síntomas.

La inmunoglobulina puede ser usada, por ejemplo, como terapia de mantenimiento para pacientes con MG moderada a severa, típicamente cuando otros tratamientos han sido inefectivos o han causado severos efectos secundarios, y también puede ser administrada antes de la timectomía o

durante una exacerbación aguda de la enfermedad (crisis miasténica). La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa, a pacientes con miastenia gravis usando los métodos descritos en la presente. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con MG. Por ejemplo, a un paciente con MG se le pueden administrar dosis de 400 mg/kg de peso corporal a 2 g/kg de peso corporal cada 4 -6 semanas para terapia de mantenimiento. Antes de timectomía o durante crisis miasténica, 1 - 2 g/kg de peso corporal pueden ser administrados en varias dosis, como, por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg de peso corporal en cinco días consecutivos. En otro ejemplo, 1 g/kg de peso corporal pueden ser administrados en 2 días consecutivos.

11. Síndrome de Moersch-Woltmann

El síndrome de Moersch-Woltmann, también conocido como síndrome de la persona rígida o síndrome del hombre rígido, es un raro trastorno neurológico con características de una enfermedad autoinmune. Los pacientes se presentan con síntomas relacionados con rigidez muscular y espasmos episódicos superpuestos. La rigidez muscular se extiende para involucrar los músculos axiales, primeramente abdominal y tóracolumbar, así como también músculos de los miembros

proximales. Típicamente, la co-contracción de músculos agonistas y antagonistas truncales conduce a una apariencia como tabla con hiperlordosis. Menos frecuentemente, la implicación del músculo respiratorio conduce a la dificultad respiratoria y la implicación del músculo facial a una cara como máscara. El tratamiento con inmunoglobulina puede efectuar rigidez disminuída y evaluaciones de sensibilidad elevadas en pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann (Dalakas y colaboradores (2001) N Engl J Med 345(26):1870-6). La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa, a pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann usando los métodos descritos en la presente. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunolgobulina a pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann. Por ejemplo, la inmunoglobulina puede ser administrada a dosis de 400 mg/kg de peso corporal en cinco días consecutivos. A algunos pacientes se les puede dar terapia de mantenimiento, la cual puede incluir por ejemplo, 1 - 2 g de inmunolgobulina por kg de peso corporal cada 4 - 6 semanas. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser aumentada o disminuída según sea apropiado.

12.Enfermedad de Alzheimer

El tratamiento para la enfermedad de Alzheimer

incluye tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (véase por ejemplo, Dodel y colaboradores (2004) J Neurol Neurosurg. Psychiatry, 75: 1472-4; Solomon y colaboradores (2007) Curr. Opin. Mol. Ther., 9:79-85; Relkin y colaboradores (2008) Neurobiol Aging). La IG contiene anticuerpos que enlazan al beta amiloide (AB), el cual es un componente central de la placa en los cerebros de pacientes de Alzheimer. Por consiguiente, la IG puede ayudar a promover la eliminación de AB desde el cerebro y bloquear los efectos tóxicos de AB's en las células cerebrales. Por lo tanto, la inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa, a pacientes con enfermedad de Alzheimer usando los métodos descritos en la presente. Los sujetos a ser tratados incluyen pacientes que tienen enfermedad de Alzheimer ligera, moderada o avanzada. Esta en el nivel de la experiencia de un médico tratante identificar a pacientes para tratamiento. La imunoglobulina en combinación con hialuronidasa puede ser administrada cada semana, cada dos semanas o una vez al mes. El tratamiento puede continuar durante el transcurso de meses o años. La IG puede ser administrada a dosis de o entre 200 mg/kg de PC a 2 mg/kg de PC cada semana o cada dos semanas, y generalmente al menos 200 mg/kg a 2 g/kg de PC al menos una vez al mes. El tratamiento con inmunoglobulina puede efectuar un incremento

en los niveles del anticuerpo anti-beta-amiloide de pacientes en comparación con los niveles antes de tratamiento.

13.Otras Enfermedades y Condiciones

Los datos clínicos indican que la inmunoglobulina puede ser usada en el tratamiento de muchas condiciones. En algunos casos, la inmunoglobulina puede ser usada en el tratamiento primario, mientras que en otros casos, es administrada como terapia de segunda línea cuando las terapias estándares han probado no ser efectivas, se han vuelto intolerables o son contra-indicadas. Está en la experiencia de un médico tratante identificar dichas enfermedades o condiciones. Ejemplares de éstas incluyen, pero no se limitan a, hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada positiva a ANCA; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT); enfermedad de Alzheimer, síndrome hematofagocítico; trasplante de células embrionarias hematopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatía paraproteinémica de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia por opsoclonus mioclonus; penfigo

foliáceo; penfigo vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de choque tóxico; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; trasplante de médula ósea; tumores por células T; y traumatismo.

También se ha mostrado que la inmunoglobulina tiene actividad antimicrobiana contra numerosas infecciones bacterianas, virales y fúngicas, incluyendo, pero no limitándose a, Haemophilus influenzae de tipo B, Pseudomonas aeruginosas de tipos A y B, Staphylococcus aureus, Streptococcus del Grupo B, Streptococcus penumoniae de los tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19 y 23, Adenovirus de los tipos 2 y 5, Citomegalovirus, virus de Epstein Barr, VCA, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, influenza A, tosferina, parainfluenza de los tipos 1, 2 y 3, Polio, virus del herpes zóster, varicela, Aspergillus y Candida albicans. Por consiguiente, la inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente en combinación con hialuronidasa a pacientes con infecciones bacterianas, virales y fúngicas para aumentar el sistema inmune del paciente y tratar la enfermedad. En algunos ejemplos, también son administrados antibióticos u otros antimicrobianos.

I.Artículos de Fabricación y Equipos

Las composiciones farmacéuticas de inmunoglobulina y una hialuronidasa soluble, proporcionadas juntas o separadamente, pueden ser empacadas como artículos de fabricación que contengan material de empaque, una composición farmacéutica la cual sea efectiva para tratar una enfermedad o condición tratable con IG, y una etiqueta que indique que la composición y las combinaciones son para ser usadas para tratar enfermedades y condiciones tratables con IG. Ejemplares de artículos de fabricación son contenedores incluyendo contenedores de cámara individual y de cámara dual. Los contenedores incluyen, pero o se limitan a, tubos, botellas y jeringas. Los contenedores pueden incluir adicionalmente una aguja para administración subcutánea.

Los artículos de fabricación proporcionados en la presente contienen materiales de empaque. Los materiales de empaque para uso al empacar productos farmacéuticos son bien conocidos para el experto en el arte. Véase por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5,323,907, 5,033,252 y 5,052,558, cada una de las cuales es incorporada íntegramente a la presente. Ejemplos de materiales de empaque farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, empaques vesiculares, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, frasquitos, contenedores, jeringas, botellas, y cualquier material de empaque adecuado para una formulación seleccionada y el modo previsto de

administración y tratamiento. Un amplio grupo de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionadas en la presente son contemplados cuando son una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad o condición tratable por IG.

Las composiciones de inmunoglobulina y de hialuronidasa soluble, proporcionadas juntas o separadamente, también pueden ser proporcionadas en equipos. Los equipos pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente y un artículo para administración. Por ejemplo las composiciones pueden ser suministradas con un dispositivo para administración, como una jeringa, un inhalador, un recipiente de dosificación, un gotero, o un aplicador. El equipo puede incluir, opcionalmente, instrucciones para aplicación incluyendo dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para modos de administración. Los equipos pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente y un artículo para diagnóstico. Por ejemplo, dichos equipos incluyen un artículo para medir la concentración , cantidad o actividad de la IG.

J. EJEMPLOS

Se incluyen los siguientes ejemplos para propósitos ilustrativos solamente y no se pretende limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

PH20 recombinante Humana Soluble (rHuPH20) Facilita la Administración Subcutánea de Inmunoglobulina (IG) y la Biodisponibilidad

La administración subcutánea (SC) de inmunoglobulina (IG) da como resultado la biodisponibilidad reducida en comparación con la administración intravenosa (IV). Un estudio reportó 63 % de biodisponibilidad en comparación con la administración IV, requiriéndose así una dosis de 137 % de la dosis IV a ser usada para lograr una biodisponibilidad equivalente, es decir, el área bajo la curva (AUC) de tiempo-concentración (Ochs y colaboradores (2006) J Clin. Immunol., 26:265-273). Por consiguiente, se efectuaron experimentos para determinar si la administración de IG (GAMMAGARD LIQUID (GGL), Baxter Biosciences) en la presencia de PH20 recombinante humana soluble (rHuPH20) incrementó la biodisponibilidad de IG después de administración SC de IG, poniendo en evidencia la necesidad de dosis crecientes. El estudio experimental fue diseñado para evaluar 1) la habilidad de los sujetos para tolerar una dosis mensualmente de GGL en un sitio único vía la ruta subcutánea (SC); 2)la dosis de rHuPH20 por gramo de GGL requerida para tolerar una dosis mensualmente de GGL, con no más que ligeras reacciones adversas locales al fármaco; 3)el

tiempo requerido para administración SC; y 4)una comparación de la biodisponibilidad medida por medio del área bajo la curva (AUC) de GGL IV versus SC.

Resumiendo, fueron enrolados en el estudio once pacientes adultos inmunodeficientes quienes estuvieron sobre dosis estables de gamaglobulina intravenosa (IVIG). Todos los pacientes permanecieron sobre las mismas dosis mensuales de IVIG que recibieron antes del estudio. Para administración subcutánea, los pacientes que habían recibido hasta 600 mg/kg de PC de GGL cada cuatro semanas IV, recibieron infusiones SC en un sitio único comenzando a una dosis que fue un cuarto de la dosis IV durante IV semanas, es decir una dosis por semana, para determinar la dosis de rHuPH20 requerida para tolerar una dosis a la semana. Subsecuentemente, dosificaciones de rHuPH20 fueron reducidas y los pacientes recibieron la 2, 3, y finalmente una dosis total de GGL la cuarta semana para determinar la rHuPH20 mínima requerida para tolerar una infusión una vez al mes de GGL SC.

Las infusiones iniciales se condujeron usando 150 U de rHuPH20 por gramo de GGL. La rHuPH20 fue administrada a través de una aguja SC calibre 24 a una concentración de 150 U/mL o 1500 U/mL a una velocidad de 1 - 2 mL/min, antes de la infusión de GGL. Si se usaron 1500 U/mL de rHuPH20, se diluyó como sigue: a) si el volumen de la solución concentrada de

rHuPH20 (1500 U/mL) necesitado fue de 1.5 mL o menos, fue diluida 1:10 usando solución salina inyectable normal; b) si el volumen del concentrado necesitado de rHuPH20 (1500 U/mL) fue superior a 1.5 mL pero inferior a 15 mL, se diluyó a 15 litros con solución salina inyectable normal; si el volumen de la solución de rHuPH20 concentrada (1500 U/mL) necesitado fue 15 mL o más, se usó sin diluir.

Inmediatamente después de la infusión de rHuPH20 (y en 5 minutos), la GGl fue infusionada a través de la misma aguja SC calibre 24 que comenzó a una dosis que fue un cuarto de la dosis cada 4 semanas (es decir 1 dosis por semana) para determinar la cantidad de rHuPH20 necesitada para dar un cuarto de la dosis de 4 semanas en un sitio único. Cada paciente fue evaluado para determinar si la infusión fue tolerada ; se juzgó que la infusión no fue tolerada si hubo reacciones locales moderadas o severas que requieran más de un sitio de administración o una incapacidad para terminar la infusión en menos de 3 horas. Si la dosis semanal de GGl fue tolerada, la mitad de la dosis (dos dosis por semana) fue administrada usando rHuPH20 a 100 U/g de GGL, y la dosis de rHuPH20 fue adicionalmente reducida a 66 U/g de GGL, luego 50 U/g de GGL. La dosis de rHuPH20 se repitió, sobre una base por gramo de GGL, con cantidades crecientes de GGL hasta una dosis de GGL total a 4 semanas, fue tolerada en un sitio

único. Si la cantidad de rHuPH20 no fue tolerada en cualquier punto, entonces se repitió la dosis semanalmente de GGl en el siguiente intervalo y la cantidad de rHuPH20 fue incrementada hasta que la dosis fue tolerada. Si un sujeto falla en tolerar una dosis por dos incrementos sucesivos en la dosis de rHuPH20 (es decir, 3 intentos a una dosis distinta de GGL), entonces se determinó que la dosis tolerada previamente fue la dosis máxima tolerada.

Los primeros cuatro pacientes fueron evaluados para tolerancia solamente; los últimos 7 pacientes tuvieron una infusión IV, seguida por un estudio farmacocinético (PK) para comparar la infusión IV con las infusiones SC subsecuentes. Para las infusiones SC, después de que s e logró una administración de dosis de GGL mensualmente, se repitió la misma dosis mensualmente y se efectuó un estudio PK para evaluar la T1/2, Tmax, y AUC. Si AUC(SC) no estuvo en el 90 % de la AUC(IV), la dosis de rHuPH20 fue incrementada 4 veces en la siguiente infusión, y se repitió la evaluación PK.

Diez de los 11 pacientes lograron dosis mensuales de 25.5 a 61.2 gramos de GGL (255 a 612 mL) en un sitio SC único, a velocidades de 120 a 300 mL/hora. El onceavo paciente se lo retiró después de la infusión en la primera semana manifestando incomodidad local: Para el primer paciente (39001), las infusiones iniciales fueron hechas por

gravedad, no obstante, las velocidades no fueron aceptables incrementando la dosis de rHuPH20 desde 150 a 300 U/g de GGL. Por consiguiente, todas las infusiones subsecuentes fueron hechas usando una bomba peristáltica para IV. Los 9 pacientes restantes lograron la dosis de GGl mensualmente sin la necesidad de repetir dosis o de incrementar la concentración de rHuPH20. Por consiguiente, los 9 pacientes en quienes se hizo un intento de reducir la dosis de rHuPH20 completaron el estudio y fueron capaces de tolerar las infusiones usando 50 U/g de GGL. Para determinar si 50 U/g de GGL fue la rHuPH20 mínima que podía ser administrada., una dosis de 25 U/g de GGL se intentó en dos pacientes sin éxito: uno tuvo incomodidad y el otro tuvo tolerancia reducida y requirió administración en dos sitios. Por consiguiente, la cantidad mínima de rHuPH20 que permitió una administración de dosis mensualmente de GGL SC fue de 50 U/g de GGL. Los resultados se resumen en la Tabla 3 siguiente. Los resultados mostraron que los primeros dos pacientes fueron infusionados a velocidades de hasta 300 mL/hr con tiempos de infusión de 1.64 h (270 mL) a 3.55 h (537 mL). La velocidad de administración estuvo limitada primeramente por el tipo de bomba usada. La bomba para IV frecuentemente alarmó con velocidades de infusión rápidas. Una infusión se hizo lenta y

una fue interrumpida debido a dolor ligero en el sitio de infusión. Ambas infusiones se abreviaron y fueron terminadas.

Tabla 3: Parámetros de Infusión para Pacientes que Completaron Exitosamente Infusiones SC Mensuales

A	B	C	D	E	F	G
390001	1	25.5	255	305.9	175	2.13
390003	1	30.1	301	46.9	200	2.38
400001	1	44.5	445	49.8	300	3.05
340001	3	30.3	303	52.5	300	3.02
340002	4	39.9	399	50.0	300	3.20
390004	4	29.3	293	50.8	300	1.92
390005	3	27.2	272	50.6	300	1.64
390006	3	61.4	614	50.0	300	2.75
400002	3	53.7	537	51.5	300	3.55
400003	3	42.1	421	48.8	300	2.29

A = Sujetos (N = 10)

B = Número de infusiones de dosis mensuales

C = IgG (g) por dosis infusionada (media)

D = Volumen (mL) de IgG infusionado (media)

E = Concentración final de rHuPH20 (U/g)

F = Velocidad máxima de infusión (mL/hr)

G = Tiempo (horas) para infusionar (media)

1.Evaluación de la Tolerancia

Los sujetos fueron evaluados por su tolerancia a las infusiones SC. La mayoría de las infusiones fueron asociadas solamente con reacciones ligeras relacionadas con la infusión (tabla 4). La mayoría de las reacciones ligeras comunes fueron eritema, dolor, hinchazón, ardor y prurito en el sitio de infusión. Las reacciones moderadas en el sitio de infusión incluyeron tres casos de dolor, y un caso cada uno de prurito, hinchazón y ardor. No se reportaron reacciones severas. Hubieron quejas de ardor transitorio durante la infusión de la rHuPH20 en 10 de las infusiones, con cinco que tuvieron lugar en un paciente.

Tabla 4: Eventos Adversos Independientemente de la Causalidad, por Períodos Correspondientes a Categorías de Dosis

Clase de Organo del Sistema MeDRA	¼ dosis SC	½ dosis SC	¼ dosis SC	Dosis SC total
Trastornos del oído y del laberinto	0	0	0	1
Trastornos oculares	0	1	0	3
Trastornos gastrointestinales	0	1	0	2
Trastornos generales y condiciones del sitio de administración	26	15	20	29

Tabla 4 (Continuación)

Clase de Organo del Sistema MeDRA	¼ dosis SC	½ dosis SC	¼ dosis SC	Dosis SC total
Trastornos del sistema inmune	0	0	0	1
Infecciones e infestaciones	1	1	1	3
Trastornos del tejido conectivo y músculoesquelético	1	1	1	0
Trastornos del sistema nervioso	2	1	0	0
Trastornos respiratorios, torácicos y mediastinales	0	0	0	4
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo	0	0	3	1
Total	30	20	25	44

Los eventos adversos generalizados relacionados con las infusiones que se consideran posibles o probables se enlistan en la Tabla 5. Fueron tres moderados y ninguno fue severo. Solamente el episodio de ligero dolor de pecho estaba asociado con la interrupción de la infusión, pero la infusión fue terminada y las infusiones subsecuentes fueron bien toleradas. La Tabla 6 expone la proporción de infusiones subcutáneas que fueron terminadas sin interrupción por un evento adverso.

Un evento adverso serio, una reacción anafiláctica, tuvo lugar en un paciente, no relacionado con la terapia de estudio. El paciente, quien tuvo una historia de reacciones

alérgicas previas a antibióticos, recibió un antibiótico el día siguiente de su infusión con GGL/rHuPH20, y subsecuentemente se desarrolló la anafilaxia. Este paciente se recuperó completamente y fue capaz de terminar exitosamente el estudio.

No hubo infecciones bacterianas documentadas durante este ensayo de pacientes de PID. Hubieron 9 casos reportados de infecciones virales, se juzgó que todas no se relacionaron con la terapia de estudio: 2 casos de gastroenteritis viral, 1 caso de queratitis herpética, 2 casos de sinusitis, 1 caso de conjuntivitis y 3 casos (en un paciente) de enfermedad similar a la influenza.

Tabla 5: Eventos Adversos generalizados, no serios, relacionados

Evento adverso en términos de MEDRA	Ligero	Moderado	Severo	Total
Ojos secos	1	0	0	1
Sudoración nocturna	1	0	0	1
Malestar musculoesquelético	0	1	0	1
Jaqueca	1	2	0	3
Letargia	1	0	0	1
Dolor de pecho	1	0	0	1
Edema periférico	1	0	0	1
Dolor	1	0	0	1
Dolor de espalda	2	0	0	2
Total de eventos adversos relacionados	9	3	0	12

Tabla 6: Proporción de Infusiones SC Completadas sin Interrupción por un Evento Adverso

Paciente	Sin interrupción	Por ciento (%)	Interrumpida	Detenida	Por ciento (%)	Infusiones totales
390001	4	80	1*	0	20	5
390002	2	100	0	0	0	2
390003	4	100	0	0	0	4
400001	4	100	0	0	0	4
340001	6	100	0	0	0	6
340002	6	86	1**	0	14	7
390004	7	100	0	0	0	7
390005	7	100	0	0	0	7
390006	6	100	0	0	0	6
400002	6	100	0	0	0	6
400003	7	100	0	0	0	7
Total	59	N/A	2	0	N/A	61

*Interrumpida debido a dolor ligero en el sitio de infusión

**Interrumpida debido a ligero dolor de pecho transitorio

2.Evaluación Farmacocinética

Se efectuaron análisis farmacocinéticos sobre niveles de IgG en suero. Los siete pacientes enrolados en la fase de evaluación PK de este estudio lograron dosis mensuales de 27 a 61 gramos de GGL en un sitio único usando 50 U de rHuPH20 por gramo de GGL (véase la Tabla 3). El estudio PK fue efectuado después de recibir una segunda dosis mensual de infusión de GGL. Se colectaron muestras de suero

pre-infusión, 1 hora post-infusión y en los días 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 21 y 28 (si se programaron 28 días) post-infusión. Los parámetros farmacocinéticos de los 7 pacientes se exponen en la Tabla 7. Las proporciones de AUC(SC) a AUC(IV) para los 7 pacientes se muestran en la Tabla 8. Los resultados muestran que cinco de los 7 pacientes tuvieron AUC(SC) en 90 % de la AUC(IV). Incrementando la dosis o rHuPH20 cuatro veces en los 2 sujetos con una proporción de menos de 90 % no hubo mejora adicional en la biodisponibilidad.

Tabla 7: Parámetros Farmacocinéticos de Sujetos Individuales

Pacientes	AUC (días*g/l)	$T_{1/2}$ (días	T_{max} (días)	C_{min} (g/l)
34001	461.2	61.3	3.0	12.9
34002*	387.1	114.1	4.9	11.3
	356.7	43.9	4.0	11.3
39004*	256.9	113.8	5.0	7.9
	264.2	44.3	6.9	7.7
39005	369.6	59.3	3.1	10.9
39006	368.9	40.3	4.8	10.8
40002	375.2	33.7	6.8	10.6
40003	356.2	37.9	4.9	9.7
Media	368.0	43.93	4.8	10.8

*Pacientes con evaluaciones PK repetidas después de administración con una dosis creciente de rHuPH20.

Tabla 8: Proporciones de $AUC_{(SC)}$ a $AUC_{(IV)}$ (%)

	Concentración de rHuPH20	
Paciente	50 U/g	200 U/g
34001	101.0	N/A
34002	8.5	79.6
39004	75.8	77.8
39005	102.7	N/A
39006	94.7	N/A
40002	97.3	N/A
40003	90.5	N/A
Media	92.6	N/A

3. Resumen de Resultados

El uso de rHuPH20 por inyección antes de infusión con GGL hace posible infusionar tanto como 600 mL de GGL en un sitio subcutáneo único a velocidades de infusión de hasta 300 mL por hora en este estudio. La velocidad fue limitada primeramente por las bombas IV que fueron usadas, las cuales son diseñadas para iniciar la alerta y detenerse cuando hay infiltración IV y la presión aumenta. Aunque la bomba se interrumpe, esto no ocurre hasta que las velocidades se aproximan a 300 mL/h, la necesidad de re-iniciar la bomba incrementa el tiempo de infusión. Ya que no hay necesidad de alarmas de presión para administración subcutánea, el

problema de interrupción debería de eliminarse conectándose a bombas capaces de generar más presión sin alertas.

Aunque la mayoría de las infusiones fueron asociadas con alguna hinchazón, enrojecimiento u ocasionalmente dolor o sarpullido, todas excepto unos cuantos fueron ligeras. Dos de las seis reacciones moderadas ocurrieron en infusiones donde la rHuPH20 fue reducida en un esfuerzo por encontrar la dosis mínima efectiva; La dosis de rHuPH20 de 50 U/g de GGL fue tolerada por 10 de los 11 sujetos. Un sujeto que no había experimentado previamente infusiones subcutáneas, se le retiró después de la primera dosis semanal que citó incomodidad en el sitio del abdomen inferior. Todas las otras infusiones fueron completadas a pesar de reacciones ligeras, con 97 % de las infusiones que fueron completadas sin interrupción. La mayoría de las reacciones fueron tratadas con compresas frías y solamente unos cuantos requirieron acetaminofeno o difenhidramina.

La biodisponibilidad media de GGL después de administrarla subcutáneamente en combinación con rHuPH20 fue de 92 % de la biodisponibilidad de GGL después de administración IV. Este estudio sugiere que la difusión creciente produjo la absorción mejorada de rHuPH20 de GGL.

Adicionalmente, los niveles mínimos logrados por medio de la dosificación subcutánea mensual de GGL en este estudio son

idénticos a los logrados por administración IV. Por consiguiente, no hay necesidad de incrementar la frecuencia de administración de GGL por dosificación subcutánea versus la dosificación IV; la administración subcutánea de GGL en combinación con rHuPH20 requiere solamente un sitio SC único y puede ser lograda a velocidades de infusión de hasta 300 mL/h.

En conclusión, rHuPH20 facilitó la administración de una dosis total mensual de GGL en un solo sitio a velocidades de hasta 300 mL/h en un grupo de sujetos adultos inmunodeficientes. La biodisponibilidad de la combinación fue de 92 % de la biodisponibilidad IV, con base en la AUC del la curva del tiempo versus la concentración de IgG. Esto sugiere que rHuPH20 mejora la absorción de GGL administrada subcutáneamente. La mayoría de los efectos secundarios locales fueron ligeros y no dieron como resultado la lentitud o la interrupción de las infusiones.

Ejemplo 2

Generación de una línea celular que expresa a rHuPH20 soluble

Se usó el plásmido HZ24 (expuesto en la SEC ID NO: 52) para transfectar a células de Ovario de Cobayo (células de CHO) (véase por ejemplo las solicitudes Nos. 10,795,095, 11/065,716 y 11/238,171). El vector plásmido HZ24 para expresión de rHuPH20 contiene una estructura principal del

vector pCI (Promega), ADN que codifica a los aminoácidos 1-482 de la hialuronidasa PH20 humana (SEC ID NO: 49), un sitio de entrada ribosómica interna (IRES, siglas del inglés Internal Ribosomal Entry Site) del virus de ECMV (Clontech), y el gen de dihidrofoliato reductasa de ratón (DHFR). La estructura principal del vector pCI también incluye ADN que codifica al gen de la resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un orígen f1 de replicación, una región promotora/mejoradora precoz inmediata del citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico, y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica a la construcción rHuPH20 soluble contiene un sitio NheI y una secuencia consensus de Kozac previa al ADN que codifica a la metionina en la posición 1 del aminoácido de la secuencia señal de 35 aminoácidos de PH20 humana, y un codón de detención después del ADN que codifica a la tirosina correspondiente en la posición del aminoácido 482 de la hialuronidasa PH20 humana expuesta en la SEC ID NO:1), seguido por un sitio de restricción BamHI. La construcción pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por consiguiente, da como resultado una especie de mARN individual activada por el promotor de CMV que codifica a los aminoácidos 1-482 de PH20 humana (expuesta en la SEC ID NO: 3) y a los aminoácidos 1-186 de la dihidrofoliato reductasa de ratón (expuestos en la SEC ID NO: 53), separados por el

sitio de entrada ribosómica interno (IRES).

Células DG44 de CHO no transfectadas que crecieron en medio CD-CHO Modificado de Gibco para células DHFR (-), suplementado con 4 mM de Glutamina y 18 mL/L de Plurionic F68/L (Gibco), fueron sembradas a 0.5 x 10^6 células/mL en un frasco agitador en preparación para transfección. Las células fueron desarrolladas a 37 °C en CO_2 a 5 % en una incubadora humidificada, sacudiendo a 120 rpm. Las células DG4 de CHO no transfectadas que crecieron exponencialmente fueron probadas para viabilidad antes de transfección.

Sesenta millones de célula viables del cultivo de células DG44 de CHO no transfectadas fueron compactadas y resuspendidas a una densidad de 2 x 10^7 células en 0.7 mL de 2x el regulador de transfección (2x HeBS: 40 mM de Hepes, pH de 7.0, 274 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 1.4 mM de Na_2HPO_4, 12 mM de dextrosa). A cada alícuota de células resuspendidas, se añadieron 0.09 mL (250 µg) del plásmido HZ24 lineal (linealizado por digestión durante toda la noche con Cla I (New England Biolabs), y las soluciones de células/ADN fueron transferidas en cubetas de electroporación BTX de espacio de 0.4 cm (Gentronics) a temperatura ambiente. Se efectuó una electroporación de control negativo sin ADN plásmido mezclado con las células. Las mezclas de células/plásmido fueron electroporadas con una descarga capacitora de 330 V y 960 µF

o a 350 V y 960 μF.

Las células fueron retiradas de las cubetas después de electroporación y fueron transferidas en 5 mL de medio CD-CHO Modificado para células DHFR (-), suplementado con 4 nM de Glutamina y 18 mL/L de Plurionic F68/L (Gibco), y se dejaron crecer en un pocillo de una placa para cultivo de tejido de 6 pocillos sin selección por 2 días a 37 °C en una incubadora humidificada, con CO_2 al 5 %.

Dos días post-electroporación, se removieron 0.5 mL de medio para cultivo de tejido de cada pocillo y se probaron para la presencia de actividad hialuronidasa, usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 3.

Tabla 9: Actividad Hialuronidasa Inicial de Células DG44 de CHO Transfectadas en HZ24 a 40 Horas Post-Transfección

	Dilución	Actividad, Unidades/mL
Transfección 1, 330 V	1 a 10	0.25
Transfección 2, 350 V	1 a 10	0.52
Control negativo	1 a 10	0.015

Las células de la Transfección 2 (350 V) fueron colectadas del pocillo de cultivo de tejido, fueron contadas y diluidas a 1 x 10^4 a 2 x 10^4 células viables por mL. Se transfirieron 0.1 mL de la alícuota de la suspensión celular a cada uno de cinco pocillos, placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron cien microlitros

de medio CD -CHO (Gibco) que contenía 4 mM del suplemento GlutaMAX™-1 (Gibco™, Invitrogen Corporation) y sin suplementos de timidina e hipoxantina a los pocillos que contenían células (volumen final de 2 mL).

Se identificaron diez clones de las 5 placas desarrolladas sin metotrexate.

TABLA 10. Actividad hialuronidasa de los clones identificados

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

Se expandieron en cultivo seis clones de HZ24 y se transfirieron en frascos agitadores como suspensiones celulares individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9,1E11, y 4D10 fueron plaqueados en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos usando la estrategia de dilución infinita bidimensional en la cual las células fueron diluidas

1:2 en la parte de abajo de la placa, y 1:3 a través de la placa, comenzando en 5000 células en el pocillo a mano izquierda superior. Los clones diluidos fueron desarrollados en un respaldo de 500 células DG44 de CHO no transfectadas por pocillo, para proporcionar los factores de crecimiento necesarios para los días iniciales en cultivo. Diez placas fueron elaboradas para subclonar, con cinco placas que contenían 50 nM de metotrexate y 5 placas sin metotrexate.

El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales (13 del tratamiento sin metotrexate y 11 del tratamiento con 50 nM de metotrexate. Se midió la actividad hialuronidasa significativa en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (> 50 Unidades/ mL), y estos 8 subclones fueron expandidos en frascos de cultivo de tejido T-25. Los clones aislados a partir del protocolo con tratamiento con metotrexate fueron expandidos en la presencia de 50 nM de metotrexate. El clon 3D35M fue expandido adicionalmente en 500 nM de metotrexate dando origen a clones que produjeron en exceso de 1,000 Unidades/mL en frascos agitadores (el clon 3D35M; o 3D35M de gen1). Se preparó entonces un banco de células madres (MCB, siglas del inglés Master Cells Bank) de las células 3D35M.

Ejemplo 3

Determinación de la Actividad Hialuronidasa de rHuPH20 soluble

Se determinó la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble en muestras tales como cultivos celulares, fracciones de purificación y soluciones purificadas usando un ensayo turbidimétrico, el cual se basó en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se enlaza a albúmina de suero. La actividad es medida por incubación de rHuPH20 con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) por un período de tiempo ajustado (10 minutos) y precipitando luego el hialuronato de sodio sin digerir con la adición de albúmina de suero acidificada. La turbidez de la muestra resultante se midió a 640 nm después de un período de desarrollo de 30 minutos. La disminución de la turbidez resultante de la actividad enzimática sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble. El método se efectuó usando una curva de calibración generada con diluciones de un ensayo con rHuPH20 soluble trabajando el estándar de referencia, y la muestra, se hicieron mediciones de actividad en relación a su curva de calibración.

Se prepararon diluciones de la muestra en Soluciones Diluyentes para Enzimas. La Solución Diluyente

para Enzimas se preparó disolviendo 33.0 ± 0.05 mg de gelatina hidrolizada en 25.0 mL del regulador de Reacción PIPES de 50 mM (140 mM de NaCl, 50 mM de PIPES, pH de 5.5) y 25 mL de SWFI, y diluyendo 0.2 mL de solución de Buminato al 25 % en la mezcla y aplicando vórtice por 30 segundos. Esto se efectuó en 2 horas de uso y se almacenó sobre hielo hasta que fue necesario. Las muestras fueron diluidas a un estimado de 1 - 2 U/mL. Generalmente, la dilución máxima por etapa no excedió de 1:100 y el tamaño de muestra inicial para la primera dilución no fue de menos de 20 µl- Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para efectuar los ensayos fueron: muestras en proceso, Fracciones de FPLC: 80 µL; Sobrenadantes de Cultivo de Tejido: 1 mL; material concentrado, 80 µL; Material de la Etapa Final o Purificado: 80 µL. Las diluciones se hicieron por triplicado en una placa de 96 pocillos para Enlace de Bajas Proteínas y 30 µL de cada dilución fueron transferidos a placas de fondo redondo Optilux Negros/Claros (BD BioSciences).

Se prepararon diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2.5 U/mL en Soluciones Diluyentes para Enzimas para generar una curva estándar y se añadieron a la placa de 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. Se incluyeron en la placa pocillos "Blanco Reactivo" que contuvieron 60 µL de Solución Diluyente para Enzimas como un control negativo. La placa fue entonces cubierta y calentada sobre un bloque de calor por 5 minutos a 37 °C. Se retiró la cubierta y la placa fue sacudida por 10 segundos. Después de sacudir, la placa fue retornada a la placa en el bloque de calor y el Dispositivo para Manejo de Líquidos MULTIDROP 384 fue cebado con la solución de 0.25 mg/mL de hialuronato de sodio templada (preparada disolviendo 100 mg de hialuronato de sodio (LifeCore Biomedical) en 20.0 mL de SWF1. Esta fue mezclada rotando suavemente y/o meciendo a 2 - 8 °C por 2 - 4 horas, o hasta disolución completa). La placa de reacción fue transferida al MULTIDROP 384 y la reacción fue iniciada presionando la tecla de inicio para distribuir 30 µL de hialuronato de sodio en cada pocillo. La placa fue entonces retirada del MULTIDROP 384 y sacudida por 10 segundos antes de ser transferida a un bloque de calor con la cubierta de la placa reubicada. La placa fue incubada a 37 °F por 10 minutos.

Se preparó el MULTIDROP 384 para detener la reacción cebando la máquina con solución de Trabajo con Suero y cambiando el ajuste de volumen a 240 µL, (25 µL de Solución

Madre con Suero [1 volumen de Suero de Caballo (Sigma) fue diluído con 9 volúmenes de Solución Reguladora de 500 mM de Acetato y se ajustó el pH a 3.1 con ácido clorhídrico] en 75 mL de Solución Reguladora de 500 mM de Acetato). La placa fue retirada del bloque de calor y colocada sobre el MULTIDROP 384 y se distribuyeron 240 µL de Solución de Trabajo de Suero en los pocillos. La placa fue retirada y sacudida sobre un lector de placas por 30 segundos. Después de 15 minutos adicionales, se midió la turbidez de las muestras a 640 nm y se determinó la actividad hialuronidasa (en U/mL) de cada muestra por ajuste a la curva estándar

Se calculó la actividad específica (Unidades/mg) dividiendo la actividad hialuronidasa (U/mL) entre la concentración de proteínas (mg/mL).

Ejemplo 4

Producción y Purificación de PH20 Humana de Gen1

A. Proceso en Bioreactor de 5 L

Un frasquito de 3D35 fue descongelado y expandido desde los frascos agitadores hasta frascos giratorios de 1 L en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) suplementado con 100 nM de Metotrexate y GlutaMAX™-1 (Invitrogen). Se transfirieron las células de los frascos rotatorios a un bioreactor de 5 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4 x 10^5 células viables por mL. Los parámetros fueron

regulación de Temperatura 37 °C, pH de 7.2 (Regulación de arranque), con Regulación de Oxígeno Disuelto de 25 % y una sobrecapa de aire de 0 -100 cc/min. A 168 horas, se añadieron 250 mL del Medio de Alimentación # 1 (CD-CHO con 50 g/L de Glucosa). A 216 horas, se añadieron 250 mL del Medio de Alimentación # 2 (CD CHO con 50 g/L de Glucosa y 10 mM de butirato de sodio), y a 264 horas se añadieron 250 mL del Medio de Alimentación # 2. Este proceso dio como resultado una productividad final de 1600 Unidades por mL con una densidad celular máxima de 6 x 10^6 células/mL. La adición de butirato de sodio fue para mejorar dramáticamente la producción de rHuPH20 en las etapas finales de producción.

El medio acondicionado del clon 3D35M fue clarificado por filtración profunda y diafiltración de flujo tangencial en 10 mM de HEPES a pH de 7.0. Se purificó luego la rHuPH20 soluble por cromatografía secuencial sobre intercambio iónico de Q Sepharose (Pharmacia), cromatografía de interacción hidrofóbica de Fenil Sepharose (Pharmacia), Cromatografía de Hidroxiapatita (Biorad, Richmond, CA). y con borato de fenilo (Prometics).

rHuPH20 soluble se enlazó a Q Sepharose y se eluyó a 400 mM de NaCl en el mismo regulador. El eluato fue diluído con sulfato de amonio 2M a una concentración final de 500 mM de sulfato de amonio y se pasó a través de una columna de

Fenil Sepharose (baja sub), seguido por enlace bajo las mismas condiciones a una resina de borato de fenilo. La rHuPH20 soluble fue eluida de la resina de fenil Separose en Hepes a pH de 6.9 después de lavar a pH de 9.0 en 50 mM de bicina sin sulfato de amonio. El eluato fue cargado sobre una resina de hidroxiapatita cerámica a pH de 6.9 en 5 mM de fosfato de potasio y 1 mM de $CaCl_2$ y eluyó con 80 mM de fosfato de potasio, pH de 7.4 con 0.1 mM de $CaCl_2$.

El rHuPH20 soluble purificado resultante poseyó una actividad específica en exceso de 65,000 Unidades USP/mg de proteína vía el ensayo de microturbidez (ejemplo 16) usando el estándar de referencia USP. Las PH20 purificadas eluyeron como un pico único desde 24 a 26 minutos a partir de una columna de estireno divinil benceno 5RPC de Pharmacia con un gradiente entre 0.1 % de TFA/H_2O y 0.1 %de TFA/ 90 % de acetonitrilo/10 % de agua y resolvió como una sola banda amplia de 61 kDa por electroforesis sobre SDS que se redujo a una banda aguzada de 51 kDa después de tratamiento con PNGASE-F. La formación de secuencias del aminoácido N-terminal reveló que el péptido líder había sido removido eficientemente.

B. Proceso de Expansión del Cultivo Celular en Dirección Opuesta de la Expresión Genética en Cultivo Celular del Bioreactor de 100 L

Se usó un proceso a mayor escala para purificar separadamente rHuPH20 soluble a partir de cuatro frasquitos diferentes de células 3D35M para producir cuatro lotes separados de sHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C. Cada frasquito fue expandido separadamente y cultivado mediante un bioreactor de 125 L, lego fue purificado usando cromatografía de columna. Se tomaron muestras en el transcurso del proceso para evaluar parámetros como el rendimiento enzimático. La descripción del proceso proporcionó las especificaciones representativas expuestas posteriormente para cosas tales como el arranque del bioreactor y volúmenes de medios de alimentación, densidades celulares de transferencia, y volúmenes de elución y lavado. Los números exactos varían ligeramente con cada lote, y se detallan en las Tablas 11 a 18.

Cuatro frasquitos que contenían células 3D35M fueron descongeladas en un baño de agua a 37 °C, se añadió medio CD CHO que contenía 100 nM de metotrexate y 40 mL/L de GlutaMAX y las células fueron centrifugadas. Las células fueron resuspendidas en un frasco con agitación de 125 mL con 20 mL de medio recientemente preparado y se colocaron en una incubadora a 37 °C, CO_2 al 7 %. Las células fueron expandidas hasta 40 mL en el frasco con agitación de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el

cultivo fue expandido en un frasco rotatorio de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. El frasco fue incubado a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco rotatorio de 250 mL en volumen de cultivo de 200 mL, y el frasco fue incubado a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco rotatorio de 1 L en volumen de cultivo de 800 mL y se incubó a 27 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco rotatorio de 6 L en volumen de cultivo de 5 L y se incubó a 27 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco rotatorio de 36 L en volumen de cultivo de 20 L y se incubó a 27 °C, CO_2 al 7 %.

Se esterilizó un reactor de 125 L con vapor a 121 °C, 1.4 kg/cm^2 (20 psi) y se añadieron 65 L de medio CD CHO. Antes de uso el reactor fue verificado para contaminación. Cuando la densidad celular en los frascos rotatorios de 36 L alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, 20 L del cultivo celular fueron transferidos desde los frascos giratorios de 36 L al bioreactor de 125 L (Braun), resultando un volumen final de 85 L y una densidad de siembra de aproximadamente 4 x 10^5

células/mL. Los parámetros fueron regulación de temperatura, 37 °C; pH: 7.2, Oxígeno Disuelto: 25 % ± 10 %, Velocidad del Impulsor: 50 rpm, Presión del Reactor: 0.21 kg/cm^2 (3 psi); Burbujeo de Aire: 1 l /min; Capa Superpuesta de Aire: 1 L/min. El reactor fue muestreado diariamente para conteo celular, verificación de pH, análisis del medio, retención y producción de proteínas. La alimentación de nutrientes fue añadida durante la corrida. Al día 6, se añadieron 3.4 L de Medio de Alimentación # 1 (CD CHO + 50 g/l de Glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX^{TM}-1) y la temperatura del cultivo se cambió a 36.5 °C. Al día 9, se añadieron 3.5 L de Medio de Alimentación # 2 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX^{TM}-1 + 1.1 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo se cambió a 36 °C. Al día 11, se añadieron 3.7 L de Medio de alimentación # 3 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX^{TM}-1 + 1.1 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo se cambió a 35.5 °C. El reactor fue cosechado a 14 días o cuando la viabilidad celular haya caído abajo de 50 %. El proceso dio como resultado la producción de rHuPH20 soluble con una actividad enzimática de 1600 Unidades/mL con una densidad celular máxima de 8 millones de células/mL. Al cosechar el cultivo fue muestreado para micoplasma, carga biológica, endotoxina, y virus in vitro e

in vivo, microscopía electrónica de transmisión (TEM, siglas del inglés Transmission Electron Microscopy) para partículas virales, y actividad enzimática.(

La cosecha del cultivo celular del bioreactor de 100 litros fue filtrada a través de una serie de filtros de cápsula desechables que tenían un medio de poliétersulfona (Sartorius): primero a través de una cápsula de 8.0 µm de profundidad, una cápsula de 0.65 µm de profundidad, una cápsula de 0.22 µm de profundidad, y finalmente a través de un filtro de 2000 cm^2 Sartopore de 0.22 µm y en una bolsa de almacenamiento estéril de 100 L. El cultivo fue concentrado 10 veces usando dos TFF con filtros MWCO de 30 kDa en Espiral de Poliéter sulfona (Millipore), seguido por un intercambio de regulador 6 veces con 10 mM de HEPES, 25 mM de Na_2SO_4, pH de 7.0 en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La Tabla 11 proporciona los datos relacionados con el cultivo celular, cosecha, concentración y etapas de intercambio de regulador.

Tabla 11. Datos de monitoreo para cultivo celular, cosecha, concentración y etapas de intercambio de regulador.

Parámetro	HUA0406C	HUA04010C	HUA0415C	HUA0420C
Tiempo de descongelación para inocular al bioreactor de 100 L (días)	21	19	17	18
Densidad de inoculación de 100 L (x 10^6 células/mL)	0.45	0.33	0.44	0.46
Tiempo de duplicación en crecimiento logarítmico (hr)	29.8	27.3	29.2	23.5
Densidad celular máxima (x 10^6 células/mL)	5.65	8.70	6.07	9.70
Viabilidad de la cosecha (%)	41	48	41	41
Título de la cosecha (U/mL)	1964	1670	991	1319
Tiempo en el bioreactor de 100 L (días)	13	13	12	13
Volumen de cosecha clarificado (mL)	81800	93300	91800	89100
Ensayo enzimático de la cosecha clarificada (U/mL)	2385	1768	1039	1425

Tabla 11 (Continuación)

Parámetro	HUA0406C	HUA04010C	HUA0415C	HUA0420C
Ensayo enzimático del concentrado (U/mL)	22954	17091	8561	17785
Ensayo enzimático del concentrado con regulador intercambiado (U/mL)	15829	11649	9915	8679
Ensayo enzimático del concentrado con regulador filtrado (U/mL)	21550	10882	9471	8527
Volumen de concentrado con regulador intercambiado (mL)	10699	13578	12727	20500
Proporción de concentración de unidades enzimáticas/cosecha	0.87	0.96	1.32	1.4

Se preparó una columna de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia) (3 L de resina, altura de 20 cm, diámetro = 14 cm. Se colectaron las muestras lavadas para una determinación de pH, conductividad y ensayo de endotoxinas (LAL). La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna

de 10 mM de Tris, 20 mM de Na_2SO_4, pH de 7.5. Se cargó la cosecha diafiltrada, concentrada sobre la columna Q a un gasto de 100 cm/ hr. La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna de 10 mM de Tris, 20 mM de Na_2SO_4, pH de 7.5 y 10 mM de Hepes, 50 mM de NaCl, pH de 7.0. La proteína fue eluída con 10 mM de Hepes, 400 mM de NaCl, pH de 7.0 y se filtró a través de un filtro final de 0.22 μm en una bolsa estéril. Después se efectuó cromatografía de interacción hidrofóbica sobre Fenil Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna Fenil Sepharose (PS) (9.1 L de resina, Altura = 29 cm, Diámetro = 20 cm). La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna de 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M, $CaCl_2$ 0.1 mM, pH de 7.0. El eluato de proteína de la columna anterior fue suplementado con sulfato de amonio 2M, fosfato de potasio 1M y solución madre de $CaCl_2$ 1M a la concentración final de 5 mM, 0.5 M y 0.1 M, respectivamente. La proteína fue cargada sobre la columna PS a un gasto de 100 cm/hr. 55 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M y 0.1 mM de $CaCl_2$, pH de 7.0 fueron añadidos a 100 cm/hr. El flujo que atravesó, fue pasado a través de un filtro final de 0.22 μm en una bolsa estéril.

La proteína purificada por PS fue cargada sobre una columna de borato de aminofenilo (ProMedics) (6.3 L de resina, Altura = 20 cm, Diámetro = 20 cm) que había sido

equilibrada con 5 volúmenes de columna de 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M. La proteína fue pasada a través de la columna a un gasto de 100 cm/hr, y la columna fue lavada con 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M,, pH de 7.0. La columna fué entonces lavada con 20 mM de bicina, 10 mM de NaCl, pH de 9.0 y la proteína eluyó con 50 mM de Hepes, 100 mM de NaCl, pH de 6. a través de un filtro estéril y en una bolsa estéril de 20 L. El eluato fue probado para carga biológica, concentración de proteína, y actividad enzimática.

Una columna de hidroxiapatita (HAP) (BioRad) (1.6 L de resina, Altura = 10 cm, Diámetro = 14 cm), se equilibró con 5 mM de fosfato de potasio, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de CaCl2, pH de 7.0. Se colectaron muestras lavadas y se probaron para pH, conductividad y endotoxinas (ensayo LAL). El La proteína purificada con borato de amino fenilo fue suplementada con fosfato de potasio y CaCl2 para producir concentraciones finales de 5 mM de fosfato de potasio y 0.1 mM de CaCl2 y se cargó sobre la columna de HAP a un gasto de 100 cm/hr. La columna fue lavada con 5 mM de fosfato de potasio a pH de 7.0, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de $CaCl_2$, luego 10 mM de fosfato de potasio pH de 7.0, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de $CaCl_2$, pH de 7.0. La proteína fue eluida con 70 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0 y se filtró a través de un

filtro de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 5 L. El eluato fue probado para carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

La proteína purificada con HAP fue entonces bombeada a través de un filtro de remoción viral de 20 nM vía un tanque a presión. La proteína fue añadida al tanque de presión DV20 y se filtró (Pall Corporation), pasando a través de un filtro Ultipor DV20 con poros de 20 nm (Pall Corporation) en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. El filtrado fue probado para concentración de proteína, actividad enzimática, oligosacáridos, monosacáridos y perfil de ácido siálico, e impurezas relacionadas con el proceso. La proteína en el filtrado fue entonces concentrada a 1 mg/mL usando un fin de filtrado de peso molecular de 10 kD (MWCO, Molecular Weight Cut Off) sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocon Slice (Sartorius). El filtro se preparó primero por lavado con una solución de Hepes/solución salina (10 nM de Hepes, 130 mM de NaCl, pH de 7.0) y el permeado fue muestreado para pH y conductividad. Después de concentración, la proteína concentrada fue muestreada y probada para concentración de proteína y actividad enzimática. Se efectuó un intercambio con 6 veces regulador sobre la proteína concentrada en el regulador final: 10 mM de Hepes, 130 mM de NaCl, pH de 7.0. La proteína concentrada fue

pasada a través de un filtro de 0.22 µm en una bolsa estéril de 20 L. La proteína fue muestreada para concentración de proteína, actividad enzimática, grupos sulfhidrilo libres, perfil de oligosacáridos y osmolaridad.

Las Tablas 12 a 18 proporcionan datos del monitoreo relacionados con cada una de las etapas descritas anteriormente, para cada lote de células 3D35M.

Tabla 12. Datos de la columna con Q Sepharose

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de carga (mL)	10647	13524	12852	20418
Proporción en volumen de carga/volumen de resina	3.1	4.9	4.5	7.3
Volumen de columna (mL)	2770	3840	2850	2880
Volumen de eluato (mL)	6108	5923	5759	6284
Concentración proteínica de eluato (mg/mL)	2.8	3.05	2.80	2.86
Ensayo enzimático de eluato (U/mL)	24493	26683	18321	21052
Rendimiento enzimático (%)	65	107	87	76

Tabla 13.Datos de la columna con Fenil Sepharose

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen antes de la adición de la solución madre (mL)	5670	5015	5694	6251
Volumen de carga (mL)	7599	6693	7631	8360
Volumen de columna (mL)	9106	9420	9340	9420
Proporción de volumen de carga/ volumen de resina	0.8	0.71	0.82	0.89
Volumen de eluato (mL)	16144	18010	16960	17328
Conc. de proteína del eluato (mg/mL)	0.4	0.33	0.33	0.38
Ensayo enzimático del eluato (U/mL)	8806	6585	4472	7509
Rendimiento de proteínas (%)	41	40	36	37
Rendimiento enzimático (%)	102	88	82	96

Tabla 14.Datos de la columna con Borato de amino fenilo

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de carga (mL)	16136	17958	16931	17884
Proporción de volumen de carga/volumen de resina	2.99	3.15	3.08	2.98
Volumen de columna (mL)	5400	5700	5500	5300
Volumen de eluato (mL)	17595	22084	20686	19145
Conc. de proteínas del eluato (mg/mL)	0.0	0.03	0.03	0.04
Conc. De proteínas del eluato filtrado mg/mL)	No probado	0.03	0.00	0.04
Ensayo enzimático del eluato (U/mL)	4050	2410	1523	4721
Rendimiento de proteínas (%)	0	11	11	12
Rendimiento enzimático (%)	N.D.	41	40	69

N.D. = No determinado

Tabla 15. Datos de la columna con Hidroxiapatita.

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen antes de adición de la solución madre (mL)	16345	20799	20640	19103
Proporción de volumen de carga/volumen de resina	10.95	13.58	14.19	12.81
Volumen de columna (mL)	1500	1540	1462	1500
Volumen de carga (mL)	16429	20917	20746	19213
Volumen de eluato (mL)	4100	2415	1936	2419
Concentración de proteínas del eluato (mg/mL)	No probada	0.24	0.17	0.23
Concentración de proteínas del eluato filtrado (mg/mL)	NA	NA	0.17	NA
Ensayo enzimático del eluato (U/mL)	14051	29089	20424	29826
Rendimiento de proteínas (%)	No probado	93	53	73
Rendimiento enzimático (%)	87	118	140	104

Tabla 16. Datos de filtración sobre DV20

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (mL)	4077	2233	1917	2419
Volumen de filtrado (mL)	4602	3334	2963	3504
Concentración de proteínas del filtrado (mg/mL)	0.1	NA	0.09	NA
Concentración de proteínas del eluato filtrado (mg/mL)	NA	0.15	0.09	0.16
Rendimiento de proteínas (%)	No probado	93	82	101

Tabla 17. Datos de concentración final.

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (mL)	4575	3298	2963	3492
Volumen del concentrado (mL)	562	407	237	316
Concentración de proteínas del concentrado (mg/mL)	0.9	1.24	1.16	1.73
Rendimiento de proteínas (%)	111	102	103	98

Tabla 18. Datos de Intercambio con Regulador en la Formulación Final

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (mL)	562	407	237	316
Concentrado Intercambiado con Regulador a volumen final (mL)	594	516	310	554
Concentración de proteínas del concentrado (mg/mL)	1.00	0.97	0.98	1.00
Concentración de proteínas del concentrado fitrado (mg/mL)	0.95	0.92	0.95	1.02
Rendimiento de proteínas (%)	118	99	110	101

La proteína rHuPH20 soluble concentrada y purificada fue llenada asépticamente en frasquitos estériles con volúmenes de llenado de 5 mL y 1 mL. La proteina fue pasada a través de un filtro de 0.22 µm a una bomba controlada por operador que se usó para llenar los frasquitos usando una terminación de llenado gravimétrica. Los frasquitos fueron cerrados con tapones y asegurados con un capuchón a presión. Los frasquitos cerrados fueron inspeccionados visualmente para partículas extrañas y luego fueron etiquetados. Después de etiquetar, los frasquitos fueron congelados instantáneamente por inmersión en nitrógeno

líquido por no más tiempo que 1 minuto y fueron almacenados a ≤ 15 °C (-20 ± 5 °C).

Ejemplo 5

Producción de Células Gen2 que Contienen PH20 Humana Soluble (rHuPH20)

La línea celular 3D35M de Gen1 descrita en el Ejemplo 2 fue adaptada para niveles más altos de metotrexate para producir clones de generación 2 (Gen2). Células 3D35M fueron sembradas a partir de cultivos que contenían metotrexate en medio de cultivo CD CHO que contenía 4 mM de GlutaMAX-1™ y 1.0 µM de metotrexate. Las células fueron adaptadas a un nivel de metotrexate más alto desarrollándolas y pasándolas 9 veces durante un período de 46 días en una incubadora a 37 °C, humidificada con CO_2 al 7 %. La población amplificada de células clonadas fueron separadas limitando la dilución en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contenían medio con 2.0 µM de metotrexate. Después de aproximadamente 4 semanas, se identificaron los clones y se seleccionó el clon 3E10B para expansión. Las células 3E10B fueron desarrolladas en medio CD CHO que contenía 4 mM de GlutaMAX-1™ y 2.0 µM de metotrexate por 20 traspasos de células. Se creó un banco de células madres (MCB, Master

Cells Bank) de la línea celular 3E10B y se congelaron y usaron para estudios subsecuentes.

La amplificación de la línea celular continuó por medio del cultivo de células 3E10B en medio CD CHO que contenía 4 mM de GlitaMAX-1™ y 4.0 μM de metotrexate. Después de la doceava vez que se traspasaron, las células fueron congeladas en frasquitos como un banco de células de investigación (RCB, Research Cells Bank). Un frasquito de RCB fue descongelado a temperatura ambiente y cultivado en medio que contenía 6.0 μM de metotrexate. Después de 5 días, la concentración de metotrexate en el medio fue decreciente a 16.0 μM, luego 20.0 μM 18 días después. Las células del octavo traspaso en medio que contenía 20.0 μM de metotrexate clonadas fueron separadas limitando la dilución en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contenía medio CD CHO que contenía 4 mM de GlutaMAX-1™ y 20.0 μM de metotrexate. Los clones fueron identificados 5-6 semanas después y se seleccionó el clon 2B2 para expansión en medio que contenía 20.0 μM de metotrexate. Después del primer traspaso, las células 2B2 fueron congeladas en frasquitos como un banco de células de investigación (RCB).

Las células 2B2 resultantes son células DG44 CHO deficientes en dihidrofoliato reductasa (dhfr-) que expresan

a PH20 recombinante humana soluble (rHuPH20). La PH20 soluble está presente en células 2B2 en un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. Análisis por tinción Southern del ADN de la célula 2B2 genómica digerida en SpeI-, Xba I- y BamH I/Hind III usando una sonda específica para rHuPH20 reveló el perfil de digestión de restricción siguiente: una banda hibridizante importante de ~ 7.7 kb y cuatro bandas hibridizantes menores (~ 13.9 ~ 6.6, ~ 5.7 y ~ 4.6 kb) con ADN digerido con Spe I; una banda hibridizante importante de ~ 5.0 kb y dos bandas hibridizantes menores (~ 13.9 y ~ 6.5 kb) con ADN digerido con Xba I; y una sola banda hibridizante de ~ 1.4 kb observada usando ADN de 2B2 digerido con BamH I/Hind III. El análisis de la secuencia del mARN transcrito indicó que la cADN derivada (SEC ID NO: 56) fue idéntica a la secuencia de referencia (SEC ID NO: 49) excepto por la diferencia de un par base en la posición 1131, la cual se observó que era timidina (T) en vez de la citosina (C) esperada. Esta es una mutación silenciosa, sin ningún efecto sobre la secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 6

A.Producción de rHuH20 soluble de Gen2 en el Cultivo Celular del Bioreactor de 300 L

Se descongeló a temperatura ambiente un frasquito de HZ24-2B2 y se expandió a partir de frascos con agitación a través de los frascos giratorios de 36 L en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 20 μM de metotrexate y GlutaMAX-1™ (Invitrogen). Resumiendo, Un frasquito de células fue descongelado en baño de agua a 37 °C, se añadió medio y las células fueron centrifugadas. Las células fueron resuspendidas en un frasco con agitación de 125 mL con 20 mL de medio recientemente preparado y se colocaron en incubadora a 37 °C, CO_2 al 7 %. Las células fueron expandidas hasta 40 mL en el frasco agitador de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzada fue mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco giratorio de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. El frasco fue incubado a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzada fue mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco giratorio de 250 mL en volumen de cultivo de 200 mL, y el frasco fue incubado a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzada fue mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco giratorio de 1 L en volumen de cultivo de 800 mL y se incubó a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzada fue mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue

expandido en un frasco giratorio de 6 L en volumen de cultivo de 5000 mL y se incubó a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzada fue mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco giratorio de 36 L en volumen de cultivo de 32 L y se incubó a 37 °C, CO_2 al 7 %.

Se esterilizó un reactor de 400 L y se añadieron 230 mL de medio CD-CHO. Antes de uso, el rector fue verificado para contaminación. Se transfirieron aproximadamente 30 L de células del frasco giratorio de 36 L al bioreactor de 400 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4.0 x 10^5 células viables por mL y un volumen total de 260 L. Los parámetros fueron temperatura regulada a 37 °C; Velocidad del Impulsor, 40 - 55 RPM; Presión del Reactor: 0.21 kg/cm^2 (3 psi); Burbujeo de Aire: 0.5 - 1.5 L/Min; Capa Superpuesta de Aire: 3 L/min. El reactor fue muestreado diariamente para conteo celular, verificación de pH, análisis del medio, producción y retención de proteína. También, durante la corrida se añadió la alimentación de nutrientes. A 120 hrs (día 5), se añadieron 10.4 L de Medio de alimentación # 1 (4 x CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 160 mL/L de GlutaMAX-1™ + 83 mL/L de Levadurato + 33 mg/L de rHuInsulina). A 168 horas (día 7), se añadieron 10.8 L de Medio de alimentación # 2 (2 x CD - CHO + 33 g/L de Glucosa + 80 mL/L de Glutamax-1™ + 167 mL/L de Levadurato + 0.92 g/L de

Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo fue cambiada a 36.5 °C. A 216 horas (día 9), se añadieron 10.8 L de Medio de Alimentación # 3 (1 x CD-CHO + 50 g/L de Glucosa + 50 mL/L de GlutaMAX-1™ + 250 mL/L de Levadurato + 1.80 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo se cambió a 36 °C. A 264 horas (día 11), se añadieron 10.8 L de Medio de Alimentación # 4 (1 x CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 33 mL/L de GlutaMAX-1™ + 250 mL/L de Levadurato + 0.92 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo se cambió a 35.5 °C. Se observó que la adición de los medios de alimentación mejoró dramáticamente la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de producción. El reactor fue cosechado a 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células cayó abajo de 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. Al cosechar, el cultivo fue muestreado para micoplasma, carga biológica, endotoxinas y viral in vitro e in vivo, Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y actividad enzimática.

El cultivo fue bombeado por medio de una bomba peristáltica a través de un sistema de filtración de cuatro módulos Millistak (Millipore) en paralelo, que contenía cada uno una capa de tierras diatomáceas calibradas a 4 - 8 µm y

una capa de tierras diatomáceas calibradas a 1.4 - 1.1 µm, seguidas por una membrana de celulosa, luego a través de un segundo sistema de filtración Millistak individual (Millipore) que contenía una capa de tierras diatomáceas calibradas a 0.4 - 0.11 µm y una capa de tierras diatomáceas calibradas a < 0.1 µm, seguido por una membrana de celulosa, y luego a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa flexible estéril de un solo uso con una capacidad de 350 L. El fluido de cultivo celular cosechado fue suplementado con 10 mM de EDTA y 10 mM de Tris a un pH de 7.5. El cultivo fue concentrado 10 veces con un aparato para filtración de flujo tangencial (TFF, Tangencial Flow Filtration) que usa cuatro filtros de poliéter sulfona (PES, Polyether sulfone) de corte de peso molecular (MWCO) de 30 kDa Sartoslice TFF (Sartorius), seguido por un inrtercambio de regulador 10 veces con 10 mM de Tris, 20 mM de Na_2SO_4, pH de 7.5 en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 50 L.

La cosecha diafiltrada, concentrada fue inactivada para virus. Previo a la inactivación viral, se preparó una solución de Triton X-100 al 10 %, fosfato de tri(n-butilo) (TNBP, Tri-N-Butil) Phosphate) al 3 %. La cosecha diafiltrada, concentrada fue expuesta a Triton X-100 al 1 %,

TNBP al 0.3 % por 1 hora en un reactor de vidrio de 36 L inmediatamente antes de purificación sobre la columna Q.

B.Purificación de la Gen2 de rHuPH20 soluble

Se preparó la columna de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia) (9 L de resina, Altura = 29 cm, D = 20 cm). Se colectaron las muestras lavadas para una determinación de pH. Conductividad y ensayo para endotoxinas (LAL). La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna de 10 mM de Tris, 20 mM de Na_2SO_4, pH de 7.5. Después de inactivación viral, la cosecha diafiltrada, concentrada fue cargada sobre la columna Q a un gasto de 100 cm/hr. La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna de 10 mM de Tris, 20 mM de Na_2SO_4, pH de 7.5 y 10 mM de Hepes, 50 mM de NaCl, pH de 7.0. La proteína fue eluída con 10 mM de Hepes, 400 mM de NaCl, pH de 7.0 en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril. La muestra de eluato fue probada para carga biológica, concentración de proteína y actividad hialuronidasa. Se tomaron lecturas de absorbancia A_{280} al principio al final del intercambio.

Se efectuó después la cromatografía hidrofóbica sobre Fenil Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna de Fenil-Sepharose (PS) (19 a 21 L de resina, Altura = 29 cm, D = 30 cm). El lavado fue colectado y muestreado para pH, conductividad y endotoxinas (ensayo LAL). La columna fue

equilibrada con 5 volúmenes de columna de 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M, 0.1 mM de $CaCl_2$, pH de 7.0. El eluato de proteína de la columna Q Sepharose fue suplementado con soluciones madres de sulfato de amonio 2M, fosfato de potasio 1 M y $CaCl_2$ 1 M para producir concentraciones finales de 5 mM, 0.5 M y 0.1 mM, respectivamente. La proteína fue cargada sobre la columna de PS a un gasto de 100 cm/hr y se colectó el flujo que atravesó la columna. La columna fue lavada con 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M y 0.1 mM de $CaCl_2$, pH de 7.0 a 100 cm/hr y los lavados fueron añadidos al flujo que atravesó la columna colectado. Combinado con el lavado de la columna, el filtrado se pasó a través de un filtro final de 0.22 μm en una bolsa estéril. El filtrado fue muestreado para carga biológica, concentración de proteínas y actividad enzimática.

Se preparó una columna de borato de aminofenilo (Promtics). El lavado fue colectado y muestreado para pH, conductividad y endotoxinas (ensayo LAL). La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna de 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M. El flujo que atravesó la columna de PS que contenía la proteína purificada fue cargado sobre la columna de borato de aminofenilo a un gasto de 100 cm/hr. La columna fue lavada con 5 mM de fosfato de

potasio, sulfato de amonio 0.5 M, pH de 7.0. La columna fue lavada con 20 mM de bicina, sulfato de amonio 0.5 M, pH de 9.0. La columna fue lavada con 20 mM de bicina, 100 mM de cloruro de sodio, pH de 9.0. La proteína fue eluida con 50 mM de Hepes, 100 mM de NaCl, pH de 6.9 y se pasó a través de un filtro estéril a una bolsa estéril. La muestra eluida fue probada para carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

Se preparó la columna de hidroxiapatita (HAP) (Biorad). Se colectó el lavado y se probó para pH, conductividad y endotoxinas (ensayo LAL). La columna fue equilibrada con 5 mM de fosfato de potasio, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de $CaCl_2$, pH de 7.0. La proteína purificada con el borato de aminofenilo fue suplementada a concentraciones finales de 5 mM de fosfato de potasio y 0.1 mM de CaCl2 y fue cargada sobre la columna de HAP a un gasto de 100 cm/hr. La columna fue lavada con 5 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de CaCl2. La columna fue después lavada con 10 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de $CaCl_2$. La proteína fue eluida con 70 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0 y fue pasada a través de un filtro estéril de 0.22 μm a una bolsa estéril. La muestra eluida fue probada para carga biológica, concentración de proteínas y actividad enzimática.

La proteína purificada sobre HAP fue luego pasada a través de un filtro para remoción viral. El filtro Virosart (Sartorius) esterilizado fue preparado primero por lavado con 2 L de 70 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0. antes de uso, el regulador filtrado fue muestreado para pH y conductividad. La proteína purificada por HAP fue bombeada vía una bomba peristáltica a través de un filtro para remoción viral de 20 nM. La proteína filtrada en 70 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0 fue pasada a través de un filtro final de 0.22 µm a una bolsa estéril. La muestra filtrada para remoción viral fue probada para concentración de proteínas, actividad enzimática, oligosacáridos, monosacáridos y perfil de ácido siálico. La muestra fue también probada para impurezas relacionadas con el proceso.

La proteína en el filtrado fue entonces concentrada a 10 mg/mL usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD Sartocon Slice (Sartorius). El filtro fue preparado primero por lavado con 10 mM de histidina, 130 mM de NaCl, pH de 6.0 y el permeado fue muestreado para pH y conductividad. Después de la concentración, la proteína concentrada fue muestreada y probada para concentración de proteínas y actividad enzimática. Se efectuó 6 veces un intercambio con regulador sobre la proteína concentrada en un regulador final: 10 mM de

histidina, 130 mM de NaCl, pH de 6.0.

Después del intercambio con regulador, la proteína concentrada fue pasada a través de un filtro de 0.22 µm a una bolsa estéril de 20 L. La proteína fue muestreada y probada para concentración de proteínas, actividad enzimática, grupos sulfhidrilo libres, perfil de oligosacáridos y osmolaridad.

La proteína bruta filtrada estéril fue entonces distribuida asépticamente a 20 mL en frasquitos de Teflón (Nalgene) estériles de 30 mL. Los frasquitos fueron entonces congelados instantáneamente y almacenados a -20 ± 5 °C.

C.Comparación de la Producción y Purificación de las Generaciones 1 y 2 de rHuPH20 soluble

La produccion y purificación de rHuPH20 soluble de Gen2 en un cultivo celular en un bioreactor de 300 L contuvo algunos cambios en los protocolos en comparación con la producción y purificación de rHuPH20 soluble de Gen1 en un cultivo celular en un bioreactor de 100 L)descrito en el Ejemplo 4.B). La Tabla 19 expone diferencias ejemplares, además de cambios a aumento de escala simple, entre los métodos.

Tabla 19

Diferencia de proceso	Generación 1 de rHuPH20 soluble	Generación 2 de rHuPH20 soluble
Línea celular	3D35M	2B2
Medios usados para expandir el inóculo celular	Contiene 0.10 µM de metotrexate (0.045 mg/L)	Contiene 20 µM de metotrexate (9 mg/L)
Medios en 6 L de cultivos hacia adelante	Contiene 0.10 µM de metotrexate	No contiene metotrexate
Frasco giratorio de 36 L	Ninguna instrumentación Volumen de operación: 20 L	Equipado con instrumentación que monitorea y controla pH, oxígeno disuelto, burbujeo y gasto de gas de la capa superpuesta.
Volumen de operación final en el bioreactor	Aprox. 100 L en un bioreactor de 125 L (volumen de cultivo inicial + 65 L)	Aprox. 300 L en un bioreactor de 400 L (volumen de cultivo inicial + 260 L)
Medios de cultivo en el bioreactor final	No rHuInsulina	5.0 mg/L de rHuInsulina
Volumen de alimentación de los medios	Escalonado a 4 % del volumen del cultivo celular del bioreactor	Escalonado a 4 % del volumen del cultivo celular del bioreactor,

Tabla 19 (Continuación)

Diferencia de proceso	Generación 1 de rHuPH20 soluble	Generación 2 de rHuPH20 soluble
	es decir, 3.4, 3.5, 3.7 L, que dio como resultado un volumen de bioreactor objetivo de ~ 92 L.	es decir, 10.4, 10.8, 11.2 y 11.7 L que dio como resultado un volumen de bioreactor objetivo de ~ 303 L.
Alimentación de Medios	Medio de Alimentación # 1:CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 8 mM de GlutaMAX™-1. Alimentación # 2 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 8 mM de GlutaMAX + 1.1 g/L de Butirato de sodio. Alimentación # 3: CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 8 mM de GlutaMax + 1.1 g/L de butirato de sodio	Medio de Alimentación # 1: 4 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + 32 mM de Glutamax + 16.6 g/L de levadurato + 33 mg/L de rHuInsulina Alimentación # 2:2 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + 16 mM de Glutamax + 33.4 g/L de levadurato + 0.92 g/L de butirato de sodio. Alimentación # 3: 1 x CDCHO + 50 g/L de Glucosa + 10 mM de Glutamax + 50 g/L de levadurato + 1.80 g/L de butirato de sodio.

Tabla 19 (Continuación)

Diferencia de proceso	Generación 1 de rHuPH20 soluble	Generación 2 de rHuPH20 soluble
		Alimentación # 4: 1 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + 6.6 mM de Glutamax + 50 g/L de Levadurato * 0.92 g/L de Butirato de Sodio.
Filtración del cultivo celular del Bioreactor	Cuatro filtros de poliétersulfona (8.0 µm, 0.65 µm y 0.22 µm) en serie	1ª. Etapa - Cuatro módulos en paralelo, cada uno con una capa de tierras diatomáceas calibrada a 4 - 8 µm y una capa de tierras diatomáceas calibradas a 1.4 - 1.1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 2ª. Etapa- módulo individual que contiene una capa de tierras diatomáceas calibradas a 0.4 - 0.11 µm y una capa de tierras diatomáceas calibradas a < 0.1 µm,

Tabla 19 (Continuación)

Diferencia de proceso	Generación 1 de rHuPH20 soluble	Generación 2 de rHuPH20 soluble
	Bolsa de almacenamiento de 100 L	Seguido por una membrana de celulosa. 3ª. Etapa: filtro de poliéter sulfona de 0.22 µm. Bolsa de Almacenamiento de 300 L. El cultivo celular cosechado es suplementado con 10 mM de EDTA, 10 mM de Tris a un pH de 7.5.
Concentración e intercambio de regulador antes de cromatografía	Concentrado con 2 con Filtros TFF con MWCO a 30 K de Poliétersulfona Millipore Spiral El concentrado intercambia de regulador 6 veces con 10 mM de Hepes, 25 mM de NaCl, pH de 7.0. Bolsa de almacenamiento estéril de 20 L.	Concentrado que usa cuatro Filtros TFF con MWCO a 30 K de Poliétersulfona Millipore Spiral El concentrado intercambia regulador 10 veces con 10 mM de Tris, 20 mM de Na2SO4, pH de 7.5. Bolsa de almacenamiento estéril de 50 L

Tabla 19 (Continuación)		
Diferencia de proceso	Generación 1 de rHuPH20 soluble	Generación 2 de rHuPH20 soluble
Inactivación viral antes de cromatografía	Ninguna	Inactivación viral efectuada con la adición de Triton X-100 al 1 %, Fosfato de tributilo al 0.3 %, pH de 7.5
Primera Etapa de purificación (Q Sepharose	Ninguna lectura de absorbancia	Mediciones de A_{280} al principio y al final
Filtración viral después de cromatografía	Filtro Pall DV-20 (20 nm)	Filtro Sartorius Virosart (20 nm)
Concentración e intercambio de regulador después de cromatografía	Regulador con Hepes/solución salina, pH de 7.0 Proteína concentrada a 1 mg/mL.	Regulador con Histidina/solución salina, pH de 6.0 Proteína concentrada a 10 mg/ml

Puesto que las modificaciones serán obvias para los expertos en el arte, está previsto que esta invención se limite solamente al alcance de las reivindicaciones anexas.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACiONES

1.- Una composición, caracterizada porque comprende inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa, caracterizada porque:

la composición es formulada para administración subcutánea;

la cantidad de IG en la composición es sustancialmente la misma que la cantidad cuando se administra intravenosamente en el mismo régimen de dosificación, y;

la cantidad de hialuronidasa en la composición es suficiente para volver a la composición terapéuticamente efectiva.

2.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el régimen de dosificación es una frecuencia de dosificación de administración de IG de no más de una vez mensualmente.

3.- La composición de conformidad con cualquiera de

la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque la cantidad de una hialuronidasa en la composición es una cantidad que es suficiente para efectuar la administración subcutánea de la IG a una dosificación administrada no más de una vez al mes.

4.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, caracterizada porque la IG y una hialuronidasa en la composición son formuladas para administración de dosificación múltiple.

5.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, caracterizada porque la inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa en la composición son formuladas para administración de dosificación individual una vez al mes.

6.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5, caracterizada porque la IG en la composición es o es de aproximadamente 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g, o 40 g.

7.- La composición de conformidad con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, caracterizada porque la hialuronidasa en la composición es de o aproximadamente de 10 Unidades a 500,000 Unidades, 100 Unidades a 100,000

Unidades, 500 Unidades a 50,000 Unidades, 1,000 Unidades a 10,000 Unidades, 5,000 Unidades a 7,500 Unidades, 5,000 Unidades a 50,000 Unidades o 1,000 Unidades a 10,000 Unidades.

8.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, caracterizada porque la composición es un líquido y el volumen del líquido es o es aproximadamente 100 mL, 150 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500, 600 ml o 700 mL.

9.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 - 8, caracterizada porque la hialuronidasa en la composición está en una cantidad que está en una proporción (unidades de hialuronidasa/gramos de IG) de o aproximadamente 10 U/gramo (g), 20 U/g, 30 U/g, 35 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g o 300 U/g.

10.- La composición de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque la hialuronidasa en la composición es administrada en una proporción de o de aproximadamente 50 U/gramo de IG.

11.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, caracterizada porque la hialuronidasa en la composición es una PH20, o una forma truncada de ésta.

12.- La composición de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque la PH20 es seleccionada de una PH20 ovina, bovina o humana truncada.

13.- La composición de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque la PH20 humana truncada es seleccionada de entre polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuestos en cualquiera de las SECS. ID. NOS: 4 - 9, o variantes alélicas u otras variantes de éstas.

14.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 - 13, caracterizada porque la hialuronidasa es designada rHuPH20.

15.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14, caracterizada porque la IG en la composición es purificada a partir de plasma humano.

16.- La composición de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque la IG en la composición purificada a partir de plasma humano es purificada por fraccionamiento alcohólico.

17.- La composición de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada porque la IG en la composición es purificada adicionalmente por medio de una cualquiera o más de una modificación química, incubación a pH de 4.0 con o sin pepsina, precipitación con polietilenglicol

(PEG), cromatografía por intercambio iónico, fraccionamiento enzimático, tratamiento con detergente-solvente, diafiltración o ultrafiltración.

18.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 17, caracterizada porque la IG en la composición contiene IgG, IgA e IgM.

19.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 18, caracterizada porque la IG en la composición contiene más de 95 % de IgG.

20.- La composición de conformidad con la reivindicación 19, caracterizada porque la IgG es monomérica.

21.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 20, caracterizada porque la IG contiene adicionalmente excipientes estabilizantes de proteínas.

22.- La composición de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque el excipiente estabilizante de proteínas es seleccionado de entre uno o más de glicina, maltosa, un poliol, albúmina de suero humano, manitol, y detergente no iónico.

23.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 22, caracterizada porque el pH de la preparación de IG en la composición es de o aproximadamente 4.2 a 5.4, 4.6 a 5.1, o 4.8 a 5.0.

24.- La composición de conformidad con cualquiera

de las reivindicaciones 1 - 23, caracterizada porque la IG en la composición tiene una concentración de proteína que es o es aproximadamente de 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de la composición de IG.

25.- El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizada porque la concentración de proteína es de 10 % en peso/volumen.

26.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 25, caracterizada porque es un líquido.

27.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 26,caracterizada porque la IG y una hialuronidasa están en una composición individual.

28.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 26, caracterizada porque la IG y una hialuronidasa son formuladas separadamente.

29.- Una composición que comprende inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa, caracterizada porque:

la composición es formulada para administración subcutánea;

la cantidad de IG en la composición es sustancialmente la misma que la cantidad cuando es administrada intravenosamente para tratamiento de una

enfermedad o condición tratable con IG; y

la cantidad de hialuronidasa en la composición es suficiente para volver a la composición efectiva terapéuticamente.

30.- La composición de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque la enfermedad o condición tratable con IG es seleccionada de entre inmunodeficiencia; hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); Síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada ANCA positiva; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células embrionarias hemopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatías para-proteinémicas de IgM; trasplante de riñón;

esclerosis múltiple; ataxia de mioclonus opsoclonus; pénfigus foliáceo; pénfigus vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

31.- La composición de conformidad con la reivindicación 29 o la reivindicación 30, caracterizada porque la cantidad de IG en la composición es o es de aproximadamente 1 gramo (g), 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g o 200 g.

32.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29 - 30, caracterizada porque la cantidad de hialuronidasa en la composición es o es aproximadamente 500 Unidades, 1,000 Unidades, 2,000 Unidades, 5,000 Unidades, 10,000 Unidades, 30,000 Unidades, 40,000 Unidades, 50,000 Unidades, 60,000 Unidades, 70,000 Unidades, 80,000 Unidades, 90,000 Unidades, 100,000 Unidades o más

33.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29 - 32, caracterizada porque la cantidad de hialuronidasa en la composición es una cantidad que está en una proporción (unidades de hialuronidasa/gramo de IG) que es o es de aproximadamente 10 U/g, 20 U/g, 30 U/g,

40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 200 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g o más.

34.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29 - 33, caracterizada porque es formulada para una frecuencia de dosificación de diaria, semanal, bisemanalmente, cada 2 - 3 semanas, cada 3 - 4 semanas o una vez al mes.

35.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29 - 34 caracterizada porque es para administración de dosificación individual.

36.-La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29 - 34, que es para administración de dosificación múltiple.

37.-Una composición caracterizada o porque comprende inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa, caracterizada porque:

la composición es formulada para administración subcutánea;

la concentración proteínica de la IG en la composición es de menos de 16 % en peso/volumen de IG; y

la cantidad de hialuronidasa en la composición es suficiente para volver a la composición terapéuticamente efectiva.

38.- La composición de conformidad con la

reivindicación 37, caracterizada porque la concentración proteínica de la IG es o es aproximadamente de 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de IG.

39.- La composición de conformidad con la reivindicación 37 o la reivindicación 38, caracterizada porque la concentración de proteína de la IG es de o de aproximadamente 10 % en peso/volumen.

40.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 37 - 39, caracterizada porque la hialuronidasa en la composición es o es de aproximadamente 500 Unidades, 1,000 Unidades, 2,000 Unidades, 5,000 Unidades, 10,000 Unidades, 30,000 Unidades, 40,000 Unidades, 50,000 Unidades, 60,000 Unidades, 70,000 Unidades, 80,000 Unidades, 90,000 Unidades, 100,000 Unidades o más.

41.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 37 - 40, caracterizada porque la IG y una hialuronidasa son como una composición individual.

42.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 37 - 40, caracterizada porque la IG y la hialuronidasa son formuladas separadamente.

43.- so de una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1- 42, para formulación de un medicamento para tratar una enfermedad o condición

tratable con Ig, en un sujeto.

44.- El uso de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es seleccionada de entre inmunodeficiencia; hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); Síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada ANCA positiva; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células germinales hemopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatías para-proteinémicas de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia de mioclonus opsoclonus; pénfigus foliáceo; pénfigus vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS);

síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

45.- El uso de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una inmunodeficiencia y la inmunodeficiencia es seleccionada de entre inmunodeficiencia variable común (CVID), agamaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), hipogamaglobulinemia primaria, enfermedades por inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agamaglobulinemia congénita o ligada al cromosoma X (XLA), hipogamaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebelar paraneoplástica sin anticuerpos.

46.- El uso de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas, y la malignidad hematológica es seleccionada de entre leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), y linfoma diferente al de Hodgkin (NHL).

47.- El uso de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable

con IG es una miopatía inflamatoria y la miopatía inflamatoria es seleccionada de entre polimiositis, dermatomiositis o miositis corporal por inclusión.

48.- El uso de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una condición bacteriana, viral o fúngica y la condición bacteriana, viral o fúngica es seleccionada de entre *Haemophilus influenzae* de typo B, *Pseudomonas aeruginosa* de tipos A y B, *Staphylococcus aureus, Streptococcus* del Grupo B, *Streptococcus penumoniae* de los tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23, Adenovirus de los tipos 2 y 5, Citomegalovirus, virus VCA de Epstein Barr, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, Influenza A, sarampión, parainfluenza de tipos 1, 2 y 3, polio, virus de varicela zóster, *Aspergillus* y C*andida albicans*.

49.- Una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 42, para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición tratable con IG en un sujeto.

50.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 49, caracterizada porque la enfermedad o condición tratable con IG es seleccionada de entre inmunodeficiencia; hipogamaglobulinemia secundaria adquirida

en malignidades hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); Síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada ANCA positiva; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células germinales hemopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatías para-proteinémicas de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia de mioclonus opsoclonus; pénfigus foliáceo; pénfigus vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

51.- La composición farmacéutica de conformidad con

la reivindicación 50, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una inmunodeficiencia y la inmunodeficiencia es seleccionada de entre inmunodeficiencia variable común (CVID), agamaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), hipogamaglobulinemia primaria, enfermedades por inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agamaglobulinemia congénita o ligada al cromosoma X (XLA), hipogamaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebelar paraneoplástica con o sin anticuerpos.

52.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas, y la malignidad hematológica es seleccionada de entre leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), y linfoma diferente al de Hodgkin (NHL).

53.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una miopatía inflamatoria y la miopatía inflamatoria es seleccionada de entre polimiositis, dermatomiositis o miositis corporal por inclusión.

54.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado porque la enfermedad o

condición tratable con IG es una condición bacteriana, viral o fúngica y la condición bacteriana, viral o fúngica es seleccionada de entre *Haemophilus influenzae* de typo B, *Pseudomonas aeruginosa* de tipos A y B, *Staphylococcus aureus*, Streptococcus del Grupo B, *Streptococcus penumoniae* de los tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23, Adenovirus de los tipos 2 y 5, Citomegalovirus, virus VCA de Epstein Barr, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, Influenza A, sarampión, parainfluenza de tipos 1, 2 y 3, polio, virus de varicela zóster, Aspergillus y Candida albicans.

55.- Una combinación de composiciones, caracterizada porque comprende:

una primera composición que comprende IG formulada para administración de una dosificación individual subcutánea en una cantidad para el tratamiento de una enfermedad tratable con IG no más de una vez al mes; y

una segunda composición que comprende una hialuronidasa soluble formulada para administración de dosificación individual en combinación con la IG para el tratamiento no más de una vez al mes.

56.- La combinación de conformidad con la reivindicación 55, caracterizada porque las composiciones están en un contenedor con cámara dual o en un solo

contenedor separadas entre sí.

57.- La combinación de conformidad con la reivindicación 56, caracterizada porque la hialuronidasa es posicionada en el contenedor para ser administrada antes de la IG.

58.- La combinación de conformidad con la reivindicación 56 o la reivindicación 57, caracterizada porque el contenedor es una jeringa, tubo o botella.

59.- La combinación de conformidad con la reivindicación 58, caracterizada porque el contendor comprende adicionalmente una aguja para inyección.

60.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55 - 359, caracterizado porque la hialuronidasa soluble es una PH20, o una forma truncada de ésta.

61.- La combinación de conformidad con la reivindicación 60, de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada porque la PH20 es seleccionada de una PH20 ovina, bovina o humana truncada.

62.- La combinación de conformidad con la reivindicación 61, caracterizada porque la PH20 humana truncada es seleccionada de entre polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NOS.: 4 - 9 o variantes alélicas u otras variantes de éstas.

63.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55 - 62, caracterizada porque la hialuronidasa soluble es designada rHuPH20.

64.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55 - 63, caracterizada porque la IG es purificada a partir de plasma humano.

65.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55 - 64, caracterizada porque la IG es liofilizada o es proporcionada en una forma líquida.

66.- La combinación de conformidad con cualquiera de la reivindicación 65, caracterizada porque el volumen del líquido es o es aproximadamente 100 mL, 150 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500, 600 ml o 700 mL.

67.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55 - 66, caracterizada porque la IG tiene una concentración de proteína que es o es aproximadamente de 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de la composición de IG.

68.- La combinación de conformidad con la reivindicación 67, caracterizada porque la concentración de proteína es de 10 % en peso/volumen.

69.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55 - 68, caracterizado porque la IG

en la composición es o es de aproximadamente 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g, 40 g.

70.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55 - 69, caracterizada porque la hialuronidasa es proporcionada en un líquido.

71.- La combinación de conformidad con la reivindicación 70, caracterizada porque el volumen de líquido es o es aproximadamente 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 20 mL o 30 mL.

72.- La combinación de conformidad con las reivindicaciones 55 - 71, caracterizada porque la hialuronidasa en la composición es de o aproximadamente de 10 Unidades a 500,000 Unidades, 100 Unidades a 100,000 Unidades, 500 Unidades a 50,000 Unidades, 1,000 Unidades a 10,000 Unidades, 5,000 Unidades a 7,500 Unidades, 5,000 Unidades a 50,000 Unidades o 1,000 Unidades a 10,000 Unidades.

73.- Una combinación de composiciones, caracterizada porque comprende:

una primera composición que comprende IG formulada para administración subcutánea en una concentración de proteína de la IG en la composición, que sea menor que 16 % en peso/volumen de IG; y

una segunda composición que comprende una hialuronidasa soluble formulada en combinación con la IG en una cantidad suficiente para volver la composición de IG terapéuticamente efectiva.

74.- La combinación de conformidad con la reivindicación 73, caracterizada porque las composiciones son formuladas para administración en dosificación individual o para administración en dosificación múltiple.

75.- La combinación de conformidad con la reivindicación 73 o la reivindicación 74, caracterizada porque la cantidad de IG en la composición es sustancialmente la misma que la cantidad en una administración de dosificación individual cuando se administra intravenosamente para tratamiento de una enfermedad o condición tratable con IG.

76.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 73-75, caracterizada porque la primera composición y la segunda composición son formuladas en una cantidad para administración diaria, semanal o bisemanalmente, cada 2-3 semanas, cada 3-4 semanas o mensualmente.

77.- La combinación de conformidad con las reivindicaciones 73-76, caracterizada porque la cantidad de IG en la primera composición es o es de aproximadamente 1

gramo (g), 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g o 200 g.

78.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 73 - 77, caracterizada porque la cantidad de hialuronidasa en la composición es o es aproximadamente 500 Unidades, 1,000 Unidades, 2,000 Unidades, 5,000 Unidades, 10,000 Unidades, 30,000 Unidades, 40,000 Unidades, 50,000 Unidades, 60,000 Unidades, 70,000 Unidades, 80,000 Unidades, 90,000 Unidades, 100,000 Unidades o más

79.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 73 - 78, caracterizada porque la cantidad de hialuronidasa en la composición es una cantidad que está en una proporción (unidades de hialuronidasa/gramo de IG) que es o es de aproximadamente 10 U/g, 20 U/g, 30 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 200 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g o más.

80.- Un equipo, caracterizado porque comprende la combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55 - 79, y opcionalmente instrucciones para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición tratable con IG.

81.- Un método para tratar una enfermedad o condición tratable con IG en un sujeto, caracterizado porque comprende:

administrar subcutáneamente al sujeto una hialuronidasa soluble; y una inmunoglobulina (IG) para tratar la enfermedad o condición, en donde la administración de la IG es efectuada de modo que la cantidad administrada y la frecuencia de administración sea sustancialmente la misma que para administración IV (intravenosa) de la misma cantidad vía IV para la misma enfermedad o condición.

82.- Un método para tratar una enfermedad o condición tratable con IG en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento, caracterizado porque comprende:

administrar subcutáneamente al sujeto una hialuronidasa soluble y una cantidad de inmunoglobulina (IG) efectiva para tratar la enfermedad o condición; en donde la administración es llevada a cabo usando un régimen de dosificación en el cual

(a) una cantidad de IG; y

(b) una frecuencia de dosificación para administraciones sucesivas de IG al sujeto

y seleccionada de modo que el efecto terapéutico de la administración subcutánea en el sujeto sea al menos sustancialmente equivalente a la administración intravenosa de la IG en el sujeto usando el mismo régimen de dosificación.

83.- El método de conformidad con la reivindicación

81 y la reivindicación 82, caracterizado porque la biodisponibilidad de la IG administrada subcutáneamente es al menos aproximadamente de 90 % de la biodisponibilidad de la misma dosificación administrada vía administración IV.

84.- El método de conformidad con la reivindicación 81 o la reivindicación 82, caracterizado porque la cantidad de hialuronidasa soluble es suficiente para volver la IG administrada terapéuticamente efectiva.

85.- El método de conformidad con la reivindicación 81 o la reivindicación 82, caracterizado porque la cantidad de hialuronidasa soluble es suficiente para efectuar administración subcutánea de la IG a una dosificación administrada no más de una vez al mes.

86.- El método de conformidad con la reivindicación 81 o la reivindicación 82, caracterizado porque la frecuencia del régimen de dosificación comprende no más que una vez mensualmente la administración de IG.

87.- El método de conformidad con la reivindicación 81 o la reivindicación 82, caracterizado porque la frecuencia del régimen de dosificación es diaria, semanal, bisemanalmente, cada 2 - 3 semanas, cada 3 - 4 semanas o mensualmente.

88.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81 - 87, caracterizado porque la

hialuronidasa soluble es una PH20, o una forma truncada de ésta.

89.- El método de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado porque la PH20 es seleccionada de una PH20 ovina, bovina o humana truncada.

90.- El método de conformidad con la reivindicación 89, caracterizado porque la PH20 humana truncada es seleccionada de entre polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NOS.: 4 - 9 o variantes alélicas u otras variantes de éstas.

91.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81 - 90, caracterizado porque la hialuronidasa soluble es rHuPH20.

92.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81 - 91 caracterizado porque la IG es purificada a partir de plasma humano.

93.- El método de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque la IG purificada a partir de plasma humano es purificada por fraccionamiento alcohólico.

94.- El método de conformidad con la reivindicación 93, caracterizado porque la IG es purificada adicionalmente por medio de una cualquiera o más de una modificación química, incubación a pH de 4.0 con o sin pepsina, precipitación con polietilenglicol (PEG), cromatografía por

intercambio iónico, fraccionamiento enzimático, tratamiento con detergente-solvente, diafiltración o ultrafiltración.

95.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81 - 94, caracterizado porque la IG en la composición contiene IgG, IgA e IgM.

96.- El método de conformidad con la reivindicación 95, caracterizado porque la IG contiene más de 95 % de IgG.

97.- El método de conformidad con la reivindicación 956, caracterizado porque la IgG es monomérica.

98.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81 - 97, caracterizada porque la IG contiene adicionalmente excipientes estabilizantes de proteínas.

99.- El método de conformidad con la reivindicación 98, caracterizado porque el excipiente estabilizante de proteínas es seleccionado de entre uno o más de glicina, maltosa, un poliol, albúmina de suero humano, manitol, y detergente no iónico.

100.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81 - 99, caracterizado porque el pH de la preparación de IG en la composición es de o aproximadamente 4.2 a 5.4, 4.6 a 5.1, o 4.8 a 5.0.

101.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81 - 100, caracterizado porque la IG tiene una concentración de proteína que es o es

aproximadamente de 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de la composición de IG.

102.- El método de conformidad con la reivindicación 101, caracterizado porque la concentración de proteína es de 10 % en peso/volumen.

103.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81 - 102, caracterizado porque la IG es infusionada a una velocidad de 10 mL/hr a 300 mL/hr.

104.- El método de conformidad con la reivindicación 103, caracterizado porque la velocidad es seleccionada de entre o aproximadamente 10 mL/hr, 20 mL/hr, 30 mL/hr, 40 mL/hr, 50 mL/hr, 60 mL/hr, 70 mL/hr, 80 mL/hr, 90 mL/hr, 100 mL/hr, 150 mL/hr, 200 mL/hr, 250 mL/hr y 300 mL/hr.

105.- El método de conformidad con la reivindicación 103 o la reivindicación 104, caracterizado porque la velocidad es controlada por medio de una bomba.

106.- El método de conformidad con la reivindicación 103 o la reivindicación 104, caracterizado porque la velocidad es controlada por gravedad.

107.- El método de conformidad con las reivindicaciones 81 - 106, caracterizado porque la IG y la hialuronidasa son administradas separadamente.

108.- El método de conformidad con la reivindicación 107, caracterizado porque la IG y la hialuronidasa son administradas simultánea o intermitentemente.

109.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81-108, caracterizado porque la hialuronidasa es administrada antes de la administración de la IG.

110.- El método de conformidad con las reivindicaciones 81 - 108, caracterizado porque la hialuronidasa es administrada 0.5 minutos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 20 minutos o 30 minutos antes de administración de la IG.

111.- El método de conformidad con las reivindicaciones 81-110, caracterizado porque la IG y la hialuronidasa están en una composición individual.

112.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81 - 111, caracterizado porque son administrados aproximadamente o 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g, 40 g de IG.

113.- El método de conformidad con cualquiera de

las reivindicaciones 81 - 112, caracterizado porque la hialuronidasa es administrada en una proporción (unidades de hialuronidasa/gramos de IG) de o aproximadamente 10 U/gramo (g), 20 U/g, 30 U/g, 35 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g o 300 U/g.

114.- El método de conformidad con la reivindicación 113, caracterizado porque la hialuronidasa es administrada en una proporción de o de aproximadamente 50 U/gramo de IG.

115.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 81-114 caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es seleccionada de entre inmunodeficiencia; hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); Síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada ANCA positiva; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia

hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células germinales hemopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatías para-proteinémicas de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia de mioclonus opsoclonus; pénfigus foliáceo; pénfigus vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

116.- El método de conformidad con la reivindicación 115, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una inmunodeficiencia y la inmunodeficiencia es seleccionada de entre inmunodeficiencia variable común (CVID), agamaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), hipogamaglobulinemia primaria, enfermedades por inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agamaglobulinemia congénita o ligada al cromosoma X (XLA), hipogamaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebelar paraneoplástica sin anticuerpos.

117.- El método de conformidad con la

reivindicación 115, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas, y la malignidad hematológica es seleccionada de entre leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), y linfoma diferente al de Hodgkin (NHL).

118.- El método de conformidad con la reivindicación 115, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una miopatía inflamatoria y la miopatía inflamatoria es seleccionada de entre polimiositis, dermatomiositis o miositis corporal por inclusión.

119.- El método de conformidad con la reivindicación 115, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una condición bacteriana, viral o fúngica y la condición bacteriana, viral o fúngica es seleccionada de entre *Haemophilus influenzae* de typo B, Pseudomonas aeruginosa de tipos A y B, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* del Grupo B, *Streptococcus penumoniae* de los tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23, Adenovirus de los tipos 2 y 5, Citomegalovirus, virus VCA de Epstein Barr, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, Influenza A, sarampión, parainfluenza de tipos 1, 2 y 3, polio, virus de varicela zóster, *Aspergillus y Candida albicans*.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BAXTER HEALTHCARE, S.A.

BAXTER INTERNATIONAL, INC.

HALOZYME, INC.

SCHIFT, Richard

LEIBL, Heinz

FROST, Gregory

<120> COMBINACIONES Y METODOS PARA ADMINISTRACIÓN SUBCUTANEA DE INMUNOGLOBULINA Y HIALURONIDASA

<130> 3800020.00095/3058PC

<140> PCT/US2009/001670

<141> 16-03-2009

<150> US 81/069,841

<151> 17-03-2008

<160> 56

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> PH20 humano precursor

<400> 1

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

```
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
                340                 345                 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
            355                 360                 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
                485                 490                 495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
            500                 505
```

<210> 2

<211> 474

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> PH20 maduro

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

<210> 3

<211> 482

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> rHuPH20 soluble precursor

<400> 3

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

```
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr
```

<210> 4

<211> 447

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> rHuPH20 1-447 soluble

<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
```

268

```
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> rHuPH20 1-446 soluble

<400> 5

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

<210> 6

<211> 445

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> rHuPH20 1-445 soluble

<400> 6

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

271

```
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*

<220>

<223> rHuPH20 1-445 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
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
```

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

<210> 8

<211> 443

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> rHuPH20 1-443 soluble

<400> 8

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

<210> 9

<211> 442

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> rHuPH20 1-442 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

```
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
```

226

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

<210> 11

<211> 553

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

<223> PH20

<400> 11

272

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

```
Ser Gln Glu Ala Ser Thr Thr Thr Phe Ser Ser Ile Ser Pro Ser Thr
                485                 490                 495
Thr Thr Ala Thr Val Ser Pro Cys Thr Pro Glu Lys His Ser Pro Glu
            500                 505                 510
Cys Leu Lys Val Arg Cys Ser Glu Val Ile Pro Asn Val Thr Gln Lys
        515                 520                 525
Ala Cys Gln Ser Val Lys Leu Lys Asn Ile Ser Tyr Gln Ser Pro Ile
    530                 535                 540
Gln Asn Ile Lys Asn Gln Thr Thr Tyr
545                 550
```

<210> 12

<211> 331

<212> PRT

<213> *Vespula vulgaris*

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 12

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

```
Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Val Tyr Val
    210                 215                 220
Arg Gln Glu Leu Thr Pro Asp Gln Arg Ile Gly Leu Val Gln Gly Arg
225                 230                 235                 240
Val Lys Glu Ala Val Arg Ile Ser Asn Asn Leu Lys His Ser Pro Lys
                245                 250                 255
Val Leu Ser Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Glu Thr Asn Thr Phe
            260                 265                 270
Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Val Ile Asn
        275                 280                 285
Gly Gly Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser
    290                 295                 300
Leu Ser Lys Cys Lys Arg Leu Gln Asp Tyr Leu Leu Thr Val Leu Gly
305                 310                 315                 320
Pro Ile Ala Ile Asn Val Thr Glu Ala Val Asn
                325                 330
```

<210> 13

<211> 340

<212> PRT

<213> *Vespula vulgaris*

<220>

<223> hialuronidasa B

<400> 13

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

280

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

<210> 14

<211> 382

<212> PRT

<213> *Apis mellifera*

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 14

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

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

<210> 15

<211> 331

<212> PRT

<213> *Dolichovespula maculata*

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 15

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

<210> 16

<211> 367

<212> PRT

<213> *Polistes annularis*

<220>

<223> hialuronidasa

283

<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*

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 17

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

```
Leu Cys Ser Glu Ala Leu Cys Ser Gly His Gly Arg Cys Val Arg His
385                 390                 395                 400
Pro Ser Tyr Pro Glu Ala Leu Leu Thr Leu Asn Pro Ala Ser Phe Ser
                405                 410                 415
Ile Glu Leu Thr His Asp Gly Arg Pro Pro Ser Leu Lys Gly Thr Leu
            420                 425                 430
Ser Leu Lys Asp Arg Ala Gln Met Ala Met Lys Phe Arg Cys Arg Cys
        435                 440                 445
Tyr Arg Gly Trp Arg Gly Lys Trp Cys Asp Lys Arg Gly Met
    450                 455                 460
```

<210> 18

<211> 473

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> hialuronidasa 2

<400> 18

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

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

<210> 19

<211> 412

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> hialuronidasa 3

<400> 19

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

<210> 20

<211> 435

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 20

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

```
Cys Val Arg Arg Pro Ser His Thr Glu Ala Leu Pro Ile Leu Asn Pro
    370                 375                 380
Ser Ser Phe Ser Ile Lys Pro Thr Pro Gly Gly Gly Pro Leu Thr Leu
385                 390                 395                 400
Gln Gly Ala Leu Ser Leu Lys Asp Arg Val Gln Met Ala Glu Glu Phe
                405                 410                 415
Gln Cys Arg Cys Tyr Pro Gly Trp Arg Gly Thr Trp Cys Glu Gln Gln
            420                 425                 430
Gly Thr Arg
        435
```

<210> 21

<211> 419

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<220>

<223> hialuronidasa 3

<400> 21

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

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

<210> 22

<211> 449

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<223> hialuronidasa 1

<400> 22

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

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

292

<220>

<223> hialuronidasa 2

<400> 23

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

```
Thr Phe Leu His Leu Ser Pro Ser Ser Phe Arg Leu Val Pro Gly Arg
385                 390                 395                 400
Thr Pro Ser Glu Pro Gln Leu Arg Pro Glu Gly Glu Leu Ser Glu Asp
                405                 410                 415
Asp Leu Ser Tyr Leu Gln Met His Phe Arg Cys His Cys Tyr Leu Gly
            420                 425                 430
Trp Gly Gly Glu Gln Cys Gln Trp Asn His Lys Arg Ala Ala Gly Asp
        435                 440                 445
Ala Ser Arg Ala Trp Ala Gly Ala His Leu Ala Ser Leu Leu Gly Leu
    450                 455                 460
Val Ala Met Thr Leu Thr Trp Thr Leu
465                 470
```

<210> 24

<211> 412

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<223> hialuronisasa 3

<400> 24

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

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

<210> 25

<211> 545

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<220>

<223> PH20

<400> 25

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

295

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

<210> 26

<211> 476

<212> PRT

<213> *Ovis aries*

<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
```

292

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

<210> 27

<211> 114

<212> PRT

<213> *Ovis aries*

<220>

<223> secuencia parcial de PH20

<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
```

298

<210> 28

<211> 414

<212> PRT

<213> *Pongo pygmaeus*

<220>

<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
```

299

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

<210> 29

<211> 510

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<220>

<223> PH20

<400> 29

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

300

```
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*

<220>

<223> PH20

<400> 30

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

302

```
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
```

<210> 32

<211> 512

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> PH20

<400> 32

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

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

<210> 33

<211> 887

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<220>

<223> hialuronidasa

<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
```

306

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

<210> 34

<211> 371

<212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes bacteriophage H4489A*

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 34

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

```
Glu Asn Ala Ala Ala Leu Ser Ile Asp Ile Val Lys Lys Gln Lys Gly
        275                 280                 285
Gly Lys Gly Thr Ala Ala Gln Gly Ile Tyr Ile Asn Ser Thr Ser Gly
    290                 295                 300
Thr Ala Gly Lys Met Leu Arg Ile Arg Asn Lys Asn Glu Asp Lys Phe
305                 310                 315                 320
Tyr Val Gly Pro Asp Gly Gly Phe His Ser Gly Ala Asn Ser Thr Val
                325                 330                 335
Ala Gly Asn Leu Thr Val Lys Asp Pro Thr Ser Gly Lys His Ala Ala
            340                 345                 350
Thr Lys Asp Tyr Val Asp Glu Lys Ile Ala Glu Leu Lys Lys Leu Ile
        355                 360                 365
Leu Lys Lys
    370
```

<210> 35

<211> 1628

<212> PRT

<213> *Clostridium perfringens*

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 35

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

```
Arg Ala Asp Asp Tyr Ala Glu Val Ala His Arg Gly Phe Ile Glu Gly
                180                 185                 190
Tyr Tyr Gly Asn Pro Trp Ser Asn Glu Asp Arg Ala Glu Leu Met Lys
        195                 200                 205
Phe Gly Gly Asp Tyr Lys Leu Asn Gln Tyr Val Phe Ala Pro Lys Asp
    210                 215                 220
Asp Pro Tyr His Asn Ser Lys Trp Arg Asp Leu Tyr Pro Glu Glu Lys
225                 230                 235                 240
Leu Ser Glu Ile Lys Lys Leu Ala Gln Val Gly Asn Glu Thr Lys Asn
                245                 250                 255
Arg Tyr Val Tyr Ala Leu His Pro Phe Met Asn Asn Pro Val Arg Phe
            260                 265                 270
Asp Thr Glu Glu Asn Tyr Gln Asn Asp Leu Gly Val Ile Lys Ala Lys
        275                 280                 285
Phe Thr Gln Leu Leu Glu Asn Asp Val Arg Gln Phe Ala Ile Leu Ala
    290                 295                 300
Asp Asp Ala Ser Ala Pro Ala Gln Gly Ala Ser Met Tyr Val Lys Leu
305                 310                 315                 320
Leu Thr Asp Leu Thr Arg Trp Leu Glu Glu Gln Gln Ser Thr Tyr Pro
                325                 330                 335
Asp Leu Lys Thr Asp Leu Met Phe Cys Pro Ser Asp Tyr Tyr Gly Asn
            340                 345                 350
Gly Ser Ser Ala Gln Leu Lys Glu Leu Asn Lys Ala Glu Asp Asn Val
        355                 360                 365
Ser Ile Val Met Thr Gly Gly Arg Ile Trp Gly Glu Val Asp Glu Asn
    370                 375                 380
Phe Ala Asn Asn Phe Met Asn Asn Ile Ser Thr Glu Gly His Pro Gly
385                 390                 395                 400
Arg Ala Pro Phe Phe Trp Ile Asn Trp Pro Cys Ser Asp Asn Ser Lys
                405                 410                 415
Gln His Leu Ile Met Gly Gly Asn Asp Thr Phe Leu His Pro Gly Val
            420                 425                 430
Asp Pro Ser Lys Ile Asp Gly Ile Val Leu Asn Pro Met Gln Gln Ala
        435                 440                 445
Glu Ala Asn Lys Ser Ala Leu Phe Ala Ile Ala Asp Tyr Ala Trp Asn
    450                 455                 460
Ile Trp Asp Asn Lys Glu Glu Ala Asp Glu Asn Trp Asn Asp Ser Phe
465                 470                 475                 480
Lys Tyr Met Asp His Gly Thr Ala Glu Glu Thr Asn Ser Ser Leu Ala
                485                 490                 495
Leu Arg Glu Ile Ser Lys His Met Ile Asn Gln Asn Met Asp Gly Arg
            500                 505                 510
Val Arg Pro Leu Gln Glu Ser Val Glu Leu Ala Pro Lys Leu Glu Ala
        515                 520                 525
Phe Lys Gln Lys Tyr Asp Ser Gly Ala Ser Ile Lys Glu Asp Ala Leu
    530                 535                 540
Glu Leu Ile Ala Glu Phe Thr Asn Leu Gln Lys Ala Ala Asp Tyr Tyr
545                 550                 555                 560
Lys Asn Asn Pro Gly Asn Glu Arg Thr Arg Asp Gln Ile Ile Tyr Trp
                565                 570                 575
Leu Asn Cys Trp Glu Asp Thr Met Asp Ala Ala Ile Gly Tyr Leu Lys
            580                 585                 590
Ser Ala Ile Ala Ile Glu Glu Gly Asp Asp Glu Ala Ala Trp Ala Asn
        595                 600                 605
Tyr Ser Glu Ala Gln Gly Ala Phe Glu Lys Ser Lys Thr Tyr Gly Phe
    610                 615                 620
His Tyr Val Asp His Thr Glu Tyr Ala Glu Val Gly Val Gln His Ile
625                 630                 635                 640
Val Pro Phe Ile Lys Ser Met Gly Gln Asn Leu Ser Val Val Ile Gly
                645                 650                 655
```

310

Ser Ile Val Asp Pro Asn Arg Ile Ile Ala Thr Tyr Ile Ser Asn Arg
660 665 670
Gln Asp Ala Pro Thr Gly Asn Pro Asp Asn Ile Phe Asp Asn Asn Ala
675 680 685
Ser Thr Glu Leu Val Tyr Lys Asn Pro Asn Arg Ile Asp Val Gly Thr
690 695 700
Tyr Val Gly Val Lys Tyr Ser Asn Pro Ile Thr Leu Asn Asn Val Glu
705 710 715 720
Phe Leu Met Gly Ala Asn Ser Asn Pro Asn Asp Thr Met Gln Lys Ala
725 730 735
Lys Ile Gln Tyr Thr Val Asp Gly Arg Glu Trp Ile Asp Leu Glu Glu
740 745 750
Gly Val Glu Tyr Thr Met Pro Gly Ala Ile Lys Val Glu Asn Leu Asp
755 760 765
Leu Lys Val Arg Gly Val Arg Leu Ile Ala Thr Glu Ala Arg Glu Asn
770 775 780
Thr Trp Leu Gly Val Arg Asp Ile Asn Val Asn Lys Lys Glu Asp Ser
785 790 795 800
Asn Ser Gly Val Glu Phe Asn Pro Ser Leu Ile Arg Ser Glu Ser Trp
805 810 815
Gln Val Tyr Glu Gly Asn Glu Ala Asn Leu Leu Asp Gly Asp Asp Asn
820 825 830
Thr Gly Val Trp Tyr Lys Thr Leu Asn Gly Asp Thr Ser Leu Ala Gly
835 840 845
Glu Phe Ile Gly Leu Asp Leu Gly Lys Glu Ile Lys Leu Asp Gly Ile
850 855 860
Arg Phe Val Ile Gly Lys Asn Gly Gly Gly Ser Ser Asp Lys Trp Asn
865 870 875 880
Lys Phe Lys Leu Glu Tyr Ser Leu Asp Asn Glu Ser Trp Thr Thr Ile
885 890 895
Lys Glu Tyr Asp Lys Thr Gly Ala Pro Ala Gly Lys Asp Val Ile Glu
900 905 910
Glu Ser Phe Glu Thr Pro Ile Ser Ala Lys Tyr Ile Arg Leu Thr Asn
915 920 925
Met Glu Asn Ile Asn Lys Trp Leu Thr Phe Ser Glu Phe Ala Ile Ile
930 935 940
Ser Asp Glu Leu Glu Asn Ala Gly Asn Lys Glu Asn Val Tyr Thr Asn
945 950 955 960
Thr Glu Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ala Lys Glu Asp Val Thr Lys Leu
965 970 975
Ile Pro Thr Asp Asp Ile Ser Leu Asn His Gly Glu Tyr Ile Gly Val
980 985 990
Lys Leu Asn Arg Ile Lys Asp Leu Ser Asn Ile Asn Leu Glu Ile Ser
995 1000 1005
Asn Asp Thr Gly Leu Lys Leu Gln Ser Ser Met Asn Gly Val Glu Trp
1010 1015 1020
Thr Glu Ile Thr Asp Lys Asn Thr Leu Glu Asp Gly Arg Tyr Val Arg
1025 1030 1035 1040
Leu Ile Asn Thr Ser Asn Glu Ala Val Asn Phe Asn Leu Thr Lys Phe
1045 1050 1055
Glu Val Asn Ser Asn Glu Val Tyr Glu Pro Ser Leu Val Asp Ala Tyr
1060 1065 1070
Val Gly Asp Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Asp Gly Asp Leu Lys Thr
1075 1080 1085
Arg Val Lys Phe Leu Gly Ala Pro Ser Thr Gly Asp Thr Ile Val Tyr
1090 1095 1100
Asp Leu Gly Gln Glu Ile Leu Val Asp Asn Leu Lys Tyr Val Val Leu
1105 1110 1115 1120
Asp Thr Glu Val Asp His Val Arg Asp Gly Lys Ile Gln Leu Ser Leu
1125 1130 1135
Asp Gly Glu Thr Trp Thr Asp Ala Ile Thr Ile Gly Asp Gly Val Glu
1140 1145 1150

Asn Gly Val Asp Asp Met Phe Ser Thr Pro Leu Lys Asn Gly Tyr Lys
1155 1160 1165
His Gly Asn Gln Ser Gly Gly Ile Val Pro Ile Asp Ser Ala Tyr Val
1170 1175 1180
Glu Gly Asp Asn Leu Asn Gln Lys Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Phe
1185 1190 1195 1200
Thr Ala Pro Tyr Arg His Arg Trp Thr Val Ile Asn Glu Leu Met Ile
1205 1210 1215
Asn Asn Gly Glu Tyr Ile Ser Thr Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ile Ser
1220 1225 1230
Asn Pro Ile Glu Glu Arg Gly Phe Ala Pro Ser Asn Leu Arg Asp Gly
1235 1240 1245
Asn Leu Thr Thr Ser Tyr Lys Pro Asn Thr Asn Asn Gly Glu Ile Ser
1250 1255 1260
Glu Gly Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Lys Thr Asp Val Arg Lys
1265 1270 1275 1280
Val Thr Ile Val Gln Ser Gly Ser Ser Ile Ser Asn Ala Lys Val Met
1285 1290 1295
Ala Arg Val Gly Asp Gly Ser Glu Asn Val Thr Asp Gln Trp Val Gln
1300 1305 1310
Leu Gly Thr Leu Ser Asn Ser Leu Asn Glu Phe Ile Asn Arg Asp Tyr
1315 1320 1325
Asn Asn Ile Tyr Glu Ile Lys Ile Glu Trp Thr Asp Val Ala Pro Asn
1330 1335 1340
Ile Tyr Glu Ile Ile Thr Leu Asn Gln Glu Phe Glu Phe Pro Val Asn
1345 1350 1355 1360
Asp Ser Leu Lys Ala Lys Tyr Asp Glu Leu Ile Asn Leu Ser Gly Asp
1365 1370 1375
Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Phe Glu Thr Leu Lys Glu Ala Leu Asn Glu
1380 1385 1390
Ala Lys Ser Ile Leu Asp Asp Ser Asn Ser Ser Gln Lys Lys Ile Asp
1395 1400 1405
Lys Ala Leu Glu Lys Leu Asn Lys Ala Glu Glu Arg Leu Asp Leu Arg
1410 1415 1420
Ala Thr Asp Phe Glu Asp Phe Asn Lys Val Leu Thr Leu Gly Asn Ser
1425 1430 1435 1440
Leu Val Glu Glu Glu Tyr Thr Ala Glu Ser Trp Ala Leu Phe Ser Glu
1445 1450 1455
Val Leu Glu Ala Ala Asn Glu Ala Asn Lys Asn Lys Ala Asp Tyr Thr
1460 1465 1470
Gln Asp Gln Ile Asn Gln Ile Val Ile Asp Leu Asp Ala Ser Ile Lys
1475 1480 1485
Ala Leu Val Lys Glu Thr Pro Glu Val Asp Lys Thr Asn Leu Gly Glu
1490 1495 1500
Leu Ile Asn Gln Gly Lys Ser Leu Leu Asp Glu Ser Val Glu Gly Phe
1505 1510 1515 1520
Asn Val Gly Glu Tyr His Lys Gly Ala Lys Asp Gly Leu Thr Val Glu
1525 1530 1535
Ile Asn Lys Ala Glu Glu Val Phe Asn Lys Glu Asp Ala Thr Glu Glu
1540 1545 1550
Glu Ile Asn Leu Ala Lys Glu Ser Leu Glu Gly Ala Ile Ala Arg Phe
1555 1560 1565
Asn Ser Leu Leu Ile Glu Glu Ser Thr Gly Asp Phe Asn Gly Asn Gly
1570 1575 1580
Lys Ile Asp Ile Gly Asp Leu Ala Met Val Ser Lys Asn Ile Gly Ser
1585 1590 1595 1600
Thr Thr Asn Thr Ser Leu Asp Leu Asn Lys Asp Gly Ser Ile Asp Glu
1605 1610 1615
Tyr Glu Ile Ser Phe Ile Asn His Arg Ile Leu Asn
1620 1625

<210> 36

<211> 435

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> hialuronidasa [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                  25                  30
Thr Thr Val Trp Asn Ala Asn Thr Gln Trp Cys Leu Glu Arg His Gly
        35                  40                  45
Val Asp Val Asp Val Ser Val Phe Asp Val Val Ala Asn Pro Gly Gln
    50                  55                  60
Thr Phe Arg Gly Pro Asp Met Thr Ile Phe Tyr Ser Ser Gln Leu Gly
65                  70                  75                  80
Thr Tyr Pro Tyr Tyr Thr Pro Thr Gly Glu Pro Val Phe Gly Gly Leu
                85                  90                  95
Pro Gln Asn Ala Ser Leu Ile Ala His Leu Ala Arg Thr Phe Gln Asp
            100                 105                 110
Ile Leu Ala Ala Ile Pro Ala Pro Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile
        115                 120                 125
Asp Trp Glu Ala Trp Arg Pro Arg Trp Ala Phe Asn Trp Asp Thr Lys
    130                 135                 140
Asp Ile Tyr Arg Gln Arg Ser Arg Ala Leu Val Gln Ala Gln His Pro
145                 150                 155                 160
Asp Trp Pro Ala Pro Gln Val Glu Ala Val Ala Gln Asp Gln Phe Gln
                165                 170                 175
Gly Ala Ala Arg Ala Trp Met Ala Gly Thr Leu Gln Leu Gly Arg Ala
            180                 185                 190
Leu Arg Pro Arg Gly Leu Trp Gly Phe Tyr Gly Phe Pro Asp Cys Tyr
        195                 200                 205
Asn Tyr Asp Phe Leu Ser Pro Asn Tyr Thr Gly Gln Cys Pro Ser Gly
    210                 215                 220
Ile Arg Ala Gln Asn Asp Gln Leu Gly Trp Leu Trp Gly Gln Ser Arg
225                 230                 235                 240
Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Met Pro Ala Val Leu Glu Gly Thr Gly
                245                 250                 255
Lys Ser Gln Met Tyr Val Gln His Arg Val Ala Glu Ala Phe Arg Val
            260                 265                 270
Ala Val Ala Ala Gly Asp Pro Asn Leu Pro Val Leu Pro Tyr Val Gln
        275                 280                 285
Ile Phe Tyr Asp Thr Thr Asn His Phe Leu Pro Leu Asp Glu Leu Glu
    290                 295                 300
```

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

<210> 37

<211> 473

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> hialuronidasa-2 [precursor]

<400> 37

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

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

<210> 38

<211> 417

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> hialuronidasa-3 [precursor]

<400> 38

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

<210> 39

<211> 481

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> hialuronidasa-4

<400> 39

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

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

<210> 40

<211> 467

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> sHuPH20 precursor 1-467

<400> 40

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

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

<210> 41

<211> 477

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> sHuPH20 precursor 1-477

<400> 41

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

<210> 42

<211> 478

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> sHuPH20 precursor 1-478

<400> 42

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

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

<210> 43

<211> 479

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> sHuPH20 precursor 1-479

<400> 43

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

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

<210> 44

<211> 480

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> sHuPH20 precursor 1-480

<400> 44

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

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

<210> 45

<211> 481

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> sHuPH20 precursor 1-481

<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
```

325

```
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*

<220>

<223> sHuPH20 precursor 1-483

<400> 46

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

322

<210> 47

<211> 432

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> sHuPH20 maduro 36-467

<400> 47

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

328

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

<210> 48

<211> 448

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> sHuPH20 maduro 36-483

<400> 48

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

329

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

<210> 49

<211> 1446

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> ADN que codifica al rHuPH20 "precursor"

<400> 49

330

```
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac                                                          1446
```

<210> 50

<211> 509

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> PH20 variante P48A

<400> 50

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

331

```
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*

332

<220>

<223> PH20 precursor variante L499W

<400> 51

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

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

<210> 52

<211> 6630

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vector de HZ24

<400> 52

```
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac 540
caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc 660
cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720
tcgtttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaat 780
tgctaacgca gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc 840
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900
actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960
tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcatg ggagtgctaa aattcaagca 1080
catctttttc agaagctttg ttaaatcaag tggagtatcc cagatagttt tcaccttcct 1140
tctgattcca tgttgcttga ctctgaattt cagagcacct cctgttattc caaatgtgcc 1200
tttcctctgg gcctggaatg ccccaagtga attttgtctt ggaaaatttg atgagccact 1260
agatatgagc ctcttctctt tcataggaag cccccgaata aacgccaccg ggcaaggtgt 1320
```

tacaatattt tatgttgata gacttggcta ctatccttac atagattcaa tcacaggagt 1380
aactgtgaat ggaggaatcc cccagaagat ttccttacaa gaccatctgg acaaagctaa 1440
gaaagacatt acattttata tgccagtaga caatttggga atggctgtta ttgactggga 1500
agaatggaga cccacttggg caagaaactg gaaacctaaa gatgtttaca agaataggtc 1560
tattgaattg gttcagcaac aaaatgtaca acttagtctc acagaggcca ctgagaaagc 1620
aaaacaagaa tttgaaaagg cagggaagga tttcctggta gagactataa aattgggaaa 1680
attacttcgg ccaaatcact tgtggggtta ttatcttttt ccggattgtt acaaccatca 1740
ctataagaaa cccggttaca atggaagttg cttcaatgta gaaataaaaa gaaatgatga 1800
tctcagctgg ttgtggaatg aaagcactgc tctttaccca tccatttatt tgaacactca 1860
gcagtctcct gtagctgcta cactctatgt gcgcaatcga gttcgggaag ccatcagagt 1920
ttccaaaata cctgatgcaa aaagtccact tccggttttt gcatataccc gcatagtttt 1980
tactgatcaa gttttgaaat tcctttctca agatgaactt gtgtatacat ttggcgaaac 2040
tgttgctctg ggtgcttctg gaattgtaat atggggaacc ctcagtataa tgcgaagtat 2100
gaaatcttgc ttgctcctag acaattacat ggagactata ctgaatcctt acataatcaa 2160
cgtcacacta gcagccaaaa tgtgtagcca agtgctttgc caggagcaag gagtgtgtat 2220
aaggaaaaac tggaattcaa gtgactatct tcacctcaac ccagataatt ttgctattca 2280
acttgagaaa ggtggaaagt tcacagtacg tggaaaaccg acacttgaag acctggagca 2340
attttctgaa aaatttttatt gcagctgtta tagcaccttg agttgtaagg agaaagctga 2400
tgtaaaagac actgatgctg ttgatgtgtg tattgctgat ggtgtctgta tagatgcttt 2460
tctaaaacct cccatggaga cagaagaacc tcaaattttc tactgaggat ccatagctaa 2520
cgcccctctc cctcccccccc ccctaacgtt actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg 2580
tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc 2640
cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa 2700
ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga 2760
caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaacc ccccacctgg cgacaggtgc 2820
ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc 2880
cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac 2940
aaggggctga aggatgccca gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg 3000
tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac 3060
ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga tgataagctt gccacaaccc acagcggccg 3120
ctgccatcat ggttcgacca ttgaactgca tcgtcgccgt gtcccaaaat atggggattg 3180
gcaagaacgg agacctaccc tggcctccgc tcaggaacga gttcaagtac ttccaaagaa 3240
tgaccacaac ctcttcagtg gaaggtaaac agaatctggt gattatgggt aggaaaacct 3300
ggttctccat tcctgagaag aatcgacctt taaaggacag aattaatata gttctcagta 3360
gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc caaaagtttg gatgatgcct 3420
taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaagtaga catggtttgg atagtcggag 3480
gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca cctcagactc tttgtgacaa 3540
ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttcccaga aattgatttg gggaaatata 3600
aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca ggaggaaaaa ggcatcaagt 3660
ataagtttga agtctacgag aagaaagact aaacgcgtgg tacctctaga gtcgacccgg 3720
gcggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 3780
aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 3840
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 3900
tcaggggggag atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat 3960
cgataaggat ccgggctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca 4020
gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt 4080
gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 4140
gctttcttcc cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg 4200
gggctcccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4260
tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg 4320
ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 4380
atctcggtct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 4440
aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
tcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 4560
ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4620
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 4680
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac 4740
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt 4800
agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920

335

```
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt ccctttttg 4980
cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 5160
gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 5220
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact 5340
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 5400
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 5460
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg 5520
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 5580
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 5640
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5700
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5760
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5940
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 6000
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 6060
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 6240
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 6300
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 6600
ggccttttgc tcacatggct cgacagatct                                  6630
```

<210> 53

<211> 186

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> dihidrofolato reductasa

<400> 53

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

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

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial de His

<220>

<223> marca de His

<400> 54

```
His His His His His His
 1               5
```

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> marca indicadora

<400> 55

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 56

<211> 1449

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Secuencia de mARN de Gen2

<400> 56

atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag tcaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactga 1449

338

MEMORIA DESCRIPTIVA CON ENMIENDAS EN FASE INTERNACIONAL

COMBINACIONES Y METODOS PARA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE INMUNOGLOBULINA Y HIALURONIDASA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan combinaciones, composiciones y equipos que contengan una composición de inmunoglobulina (IG) y una composición de hialuronidasa soluble formulada para administración subcutánea. Dichos productos pueden ser usados en métodos de tratar condiciones o enfermedades tratables con IG. También se proporcionan métodos para administración subcutánea de inmunoglobulinas con los cuales el régimen de dosificación es sustancialmente el mismo que para administración intravenosa de la misma dosificación para tratamiento de la misma enfermedad o condición tratable con IG.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La administración intravenosa (IV) de inmunoglobulina (IVIG, siglas del inglés IntraVenous Immune Globuline) es el tratamiento primario de individuos con deficiencias inmunes. Aunque las preparaciones iniciales de IVIG causaron severos efectos secundarios, las preparaciones

de IVIG disponibles actualmente son bien toleradas en la mayoría de pacientes inmunodeficientes. No obstante, una pequeña proporción de pacientes continúa teniendo reacciones desagradables, aún inhabilitadoras, como jaqueca, fatiga, y mialgia. Fiebre y escalofríos permanecen siendo un problema, especialmente cuando los pacientes tienen infecciones intercurrentes. Las reacciones, a menudo persisten a pesar de intentar otras preparaciones de IVIG o pre-medicar con acetaminofeno, difenhidramina, y corticoesteroides. Adicionalmente, debido al requerimiento por la administración IV, existen resultados con la aceptación de pacientes.

La administración subcutánea (SC) de inmunoglobulina es una alternativa a la administración intravenosa. Comparada con infusiones IV, la administración SC de inmunoglobulina tiene varias ventajas. Por ejemplo, reduce la incidencia de reacciones generalizadas, no requiere acceso IV algunas veces difícil, mejora los niveles mínimos, y da a los pacientes más independencia. A causa de la dificultad en administrar grandes cantidades de fluido en un solo sitio, es necesario hacer infusiones SC una o dos veces por semana, usando dos o tantos como 5 sitios a la vez. Así, a diferencia de IVIG, el cual es dado una vez al mes, la administración subcutánea es hecha usualmente semanalmente.

Por consiguiente, hay una necesidad por métodos alternativos para administrar inmunoglobulina.

SUMARIO DE LA INVENCION

Se proporcionan en la presente métodos, composiciones, combinaciones y equipos para administración subcutánea de inmunoglobulina y para tratar condiciones o enfermedades tratables con IG. Se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o condición tratable con IG en un sujeto administrando subcutáneamente al sujeto hialuronidasa soluble y una inmunoglobulina (IG) para tratar la enfermedad o condición. La co-administración de IG y hialuronidasa incrementa la biodisponibilidad de IG administrada subcutáneamente para permitir la administración de IG subcutáneamente usando un régimen de dosificación sustancialmente igual a la administración intravenosa de IG (IVIG) para la enfermedad o condición particular. La administración de la IG es efectuada de modo que la cantidad administrada y la frecuencia de la administración es sustancialmente la misma que para administración IV (intravenosa) de la misma cantidad vía IV para la misma enfermedad o condición. La cantidad administrada vía IV puede ser pre-determinada o es conocida para una enfermedad o condición. Típicamente, en la presencia de una hialuronidasa

341

soluble, para administración subcutánea, la velocidad de administración puede ser mayor que para administración IV. Por consiguiente, el tiempo para administración de una dosis particular puede ser reducido. La velocidad de administración puede ser controlada, por medio de una bomba o puede efectuarse por gravedad.

Así, entre los métodos proporcionados están métodos para tratar una enfermedad o condición tratable por IG en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento por administración subcutánea al sujeto de una hialuronidasa soluble y una cantidad de inmunoglobulina (IG) efectiva para tratar la enfermedad o condición. La administración es efectuada con un régimen de dosificación en el cual: (a) una cantidad de IG; y (b) una frecuencia de dosificación para administraciones sucesivas de IG al sujeto son seleccionadas de modo que el efecto terapéutico de la administración subcutánea de IG en el sujeto es al menos sustancialmente equivalente a la administración intravenosa de la IG al sujeto usando el mismo régimen de dosificación.

En algunos ejemplos de los métodos proporcionados en la presente, la biodisponibilidad de la IG administrada subcutáneamente es al menos de aproximadamente 90 % de la biodisponibilidad de la misma dosificación administrada vía administración IV. La cantidad de hialuronidasa soluble

342

administrada puede ser suficiente para efectuar administración subcutánea de la IG a una dosificación administrada no más de una vez al mes. En otros ejemplos, la administración de IG no es más de una vez mensualmente.

La hialuronidasa soluble usada en los métodos proporcionados en la presente puede ser PH20 o una forma truncada de ésta. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede ser una PH20 ovina o bovina o humana truncada. En casos en donde se usa una PH20 humana truncada en los métodos y usos proporcionados en la presente, la PH20 humana truncada puede ser seleccionada de entre polipéptidos que tengan una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NOS: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de éstas. En un ejemplo, la hialuronidasa soluble es rHuPH20.

La IG administrada usando los métodos y usos de la presente puede ser purificada a partir de plasma humano, como por fraccionamiento en medio alcohólico. En algunos ejemplos, la IG es adicionalmente purificada por medio de cualquiera de una o más de una modificación química, incubación a pH de 4.0 con o sin pepsina, precipitación con polietilenglicol (PEG), cromatografía por intercambio iónico, fraccionamiento enzimático, tratamiento con detergente como solvente, diafiltración o ultrafiltración. Los métodos y usos proporcionados en la presente pueden emplear IG que contenga

IgG, IgA e IgM. En algunos ejemplos, la IG contiene más de 95 % de IgG. Adicionalmente, la IgG puede ser monomérica. También pueden estar presentes en la IG excipientes estabilizantes de proteínas, como uno o más de glicina, maltosa, un poliol, albúmina de suero humano, manitol, y detergente no iónico. En algunos ejemplos, el pH de la preparación de IG está en o es de aproximadamente 4.2 a 5.4, 4.6 a 5.1 o 4.8 a 5.0, y la concentración de proteína es de aproximadamente 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de composición de IG. En un ejemplo, la concentración de proteínas de la IG es de 10 % en peso/volumen.

Se proporcionan en la presente métodos y usos para tratar una enfermedad o condición tratable por IG, en la cual hialuronidasa soluble y una inmunoglobulina (IG) para tratar la enfermedad o condición son administradas subcutáneamente, y la IG es infusionada a una velocidad de 10 mL/hr a 300 mL/hr, como en o aproximadamente 10 mL/hr, 20 mL/hr, 30 mL/hr, 40 mL/hr, 50 mL/hr, 60 mL/hr, 70 mL/hr, 80 mL/hr, 90 mL/hr, 100 mL/hr, 150 mL/hr, 200 mL/hr, 250 mL/hr y 300 mL/hr. La velocidad puede ser controlada por medio de una bomba o por gravedad. En algunos ejemplos, la IG y la hialuronidasa son administradas separada, simultánea o intermitentemente. Por ejemplo, la hialuronidasa puede ser

administrada antes de administración de la IG, como 0.5 minutos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 20 minutos o minutos antes de la administración de la IG. En otros ejemplos, la IG y la hialuronidasa están en una composición individual. En ejemplos adicionales, aproximadamente o 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g o 40 g de IG son administrados, y la hialuronidasa es administrada en una proporción (unidades de hialuronidasa /gramos de IG) de o aproximadamente 10 U/gramo (g), 20 U/g, 30, 35 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 300 U/g.

La hialuronidasa soluble y la IG pueden ser administradas usando los métodos y usos proporcionados en la presente para tratar, por ejemplo, inmunodeficiencia; hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP, siglas del inglés Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy); Síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis;

345

síndrome de Moersch-Woltmann; hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada ANCA positiva; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT, siglas del inglés Foeto-Maternal AlloImmune Thrombocytopenia/Neonatal AlloImmune Thrombocytopenia); síndrome hemofagocítico; trasplante de células embrionarias hemopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatías para-proteinémicas de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia de mioclonus opsoclonus; pénfigus foliáceo; pénfigus vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS, siglas del inglés Toxic Epidermal Necrolysis/Steven Johnson Syndrome); síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica. En los casos en los que se administra IG y hialuronidasa para tratar una inmunodeficiencia, la inmunodeficiencia puede ser seleccionada de entre inmunodeficiencia variable común (CVID, siglas del inglés Common Variable ImmunoDeficiency),

346

agamaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada severa (SCID, siglas del inglés Severe Combined ImmunoDeficiency), hipogamaglobulinemia primaria, enfermedades por inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agamaglobulinemia congénita o ligada al cromosoma X (XLA, siglas del inglés X-Linked Agammaglobulinemia), hipogamaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebélica paraneoplástica sin anticuerpos.

En casos en donde la enfermedad o condición tratable con IG es hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas, y la malignidad hematológica puede ser leucemia linfocítica crónica (CLL, siglas del inglés Chronic Lynphocytic Leukemia), mieloma múltiple (MM, siglas del inglés Multiple Myeloma), o linfoma diferente al de Hodgkin (NHL, siglas del inglés Non-Hodgkin's Lymphoma). En casos en donde la enfermedad o condición tratable con IG es una miopatía inflamatoria, la miopatía inflamatoria puede ser polimiositis, dermatomiositis o miositis corporal por inclusión.

En algunos ejemplos, la hialuronidasa soluble y la IG son administradas subcutáneamente para tratar una condición bacteriana, viral o fúngica, como, por ejemplo *Haemophilus influenzae* de typo B, *Pseudomonas aeruginosa* de tipos A y B, *Staphylococcus aureus, Streptococcus* del Grupo

B, *Streptococcus penumoniae* de los tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23, Adenovirus de los tipos 2 y 5, Citomegalovirus, virus VCA de Epstein Barr, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, influenza A, sarampión, parainfluenza de tipos 1, 2 y 3, polio, virus de varicela zóster, *Aspergillus* y *Candida albicans*.

Se proporcionan en la presente combinaciones de composiciones, que contienen una primera composición que contiene IG formulada para administración subcutánea de dosificación individual no más de una vez al mes, y una segunda composición que contiene una hialuronidasa soluble formulada para administración de dosificación individual no más de una vez al mes. Las composiciones pueden estar en un contenedor de cámara dual o en dos contenedores individuales separados entre sí. En algunos ejemplos, la hialuronidasa es posicionada en el contenedor para ser administrada antes de la IG. El contenedor puede ser una jeringa, tubo o botella, y puede contener adicionalmente una aguja para inyección.

Las combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente pueden contener PH20, o una forma truncada de ésta. Por ejemplo, PH20 ovina, bovina o humana truncada, como un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NOS: 4-9, o variantes

alélicas u otras variantes de éstas, pueden ser incluidas en las combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente. En algunos ejemplos, la hialuronidasa soluble en la combinación es rHuPH20. Adicionalmente la IG en las combinaciones de composiciones puede ser purificada a partir de plasma humano y puede ser liofilizada o un líquido.

En algunos ejemplos, el volumen de líquido en las combinaciones de composiciones proporcionadas en la presente es o es de aproximadamente 100 m, 150 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL o 700 mL. La IG en las combinaciones de composiciones puede tener una concentración de proteínas que es o es aproximadamente de 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de composición de IG, como por ejemplo 10 % en peso/volumen. En algunos ejemplos, la IG en la composición es o es de aproximadamente 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g, o 40 g. La hialuronidasa puede ser un líquido. En algunos ejemplos, el volumen de la hialuronidasa líquida es o es aproximadamente de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 20 mL, o 30 mL, y la hialuronidasa está en o es aproximadamente de 10 Unidades a 500,000 Unidades, 100 Unidades a 100,000 Unidades, 500 Unidades a 50,000 Unidades, 1,000 Unidades a 10,000 Unidades,

5,000 Unidades a 7,500 Unidades, 5,000 Unidades a 50,000 Unidades 1,000 Unidades a 10,000 Unidades.

Se proporcionan en la presente composiciones que contienen inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa soluble formulada para una administración en dosificación unitaria una vez al mes. La hialuronidasa soluble contenida en la composición puede ser PH20, o una forma truncada de ésta. Por ejemplo, PH20 ovina, bovina, o humana truncada, como un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NOS: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de éstas, pueden ser incluidas en las composiciones formuladas para la administración en dosificación individual proporcionada en la presente. En algunos ejemplos, la hialuronidasa soluble en la composición es rHuPH20. La IG en las composiciones puede ser purificada a partir de plasma humano, y puede ser un líquido

En modalidades ejemplares, la IG en las composiciones formuladas para administración en dosificación individual proporcionada en la presente tiene una concentración de proteínas que es o es de aproximadamente 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de la composición de IG, como por ejemplo, 10 % en peso/volumen. La IG en la composición es o es de aproximadamente 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g,

350

23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g, 40 g, y la hialuronidasa es de o es de aproximadamente 10 Unidades a 500,000 Unidades, 100 Unidades a 100,000 Unidades, 500 Unidades a 50,000 Unidades, 1,000 Unidades a 10,000 Unidades, 5,000 Unidades a 7,500 Unidades, 5,000 Unidades a 50,000 Unidades o 1,000 Unidades a 10,000 Unidades. El volumen de líquido en la composición puede ser de aproximadamente 100 mL, 150 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, o 700 mL.

Se proporcionan en la presente equipos que contienen combinaciones de composiciones, que contienen una primera composición que contiene IG formulada para administración en dosificación individual subcutánea no más de una vez al mes, y una segunda composición que contiene una hialuronidasa soluble formulada para administración en dosificación individual no más de una vez al mes. También se proporcionan en la presente composiciones que contienen inmunoglobulina (IG) y una hialuronidasa soluble formulada para administración en dosificación individual una vez al mes. Opcionalmente, pueden incluirse en los equipos, instrucciones.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Indice

A. Definiciones

B. Administración Subcutánea de Inmunoglobulina (IG)

C. Inmunoglobulina

D. Hialuronidasa

PH20 Humana Soluble

PH20 Recombinante Soluble (rHuPH20)

E. Métodos de Producir Acidos Nucleicos que codifican a una Hialuronidasa Soluble y a Polipéptidos de Esta.

1. Vectores y Células

2. Expresión

a. Células Procarióticas

b. Células de Levaduras

c. Células de Insectos

d. Células de Mamíferos

e. Plantas

3. Técnicas de Purificación

F. Preparación, Formulación y Administración de Inmunoglobulinas y Polipéptidos de Hialuronidasa Soluble

1. Formulaciones

Polvos liofilizados

2. Dosificación y Administración

G. Métodos de Evaluar la Actividad,

Biodisponibilidad y Farmacocinética

1. Farmacocinética y Tolerancia

2. Actividad Biológica

a. Inmunoglobulina

b. Hialuronidasa

H. Usos Terapéuticos

1. Inmunodeficiencia Primaria con Deficiencia de Anticuerpos

2. Hipogamaglobulinemia Secundaria Adquirida en Malignidades Hematológicas

3. Enfermedad de Kawasaki

4. Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica

5. Síndrome de Guillain-Barre

6. Púrpura Trombocitopénica Idiopática

7. Miopatías Inflamatorias: polimiositis, dermatomiositis y miositis corporal por inclusión

8. Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton

9. Neuropatía Motora Multi-focal

11. Síndrome de Moersch-Woltzmann

12. Enfermedad de Alzheimer

13. Otras Enfermedades y Condiciones

I. Artículos de fabricación y equipos

J. Ejemplos.

A. DEFINICIONES

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que comprende comúnmente un experto en el arte al cual pertenece la invención. Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes y publicadas, publicaciones, secuencias de GenBank, bases de datos, sitios de red y otros materiales publicados mencionados en el transcurso de la descripción entera de la presente, a menos que se indique de otra manera, son íntegramente incorporadas como referencia. En el caso en el que haya una pluralidad de definiciones para términos en la presente, prevalecen los de esta sección. Donde se haga referencia a una URL u otro identificador o dirección tal, se comprende que dichos identificadores pueden cambiar y la información particular en la "internet" puede ir y venir, pero la información equivalente puede ser encontrada por búsqueda en "internet". Referencia a estas evidencias, la disponibilidad y diseminación pública de dicha información

Como se usa en la presente, "inmunoglobulina", "globulina inmune", "gama globulina", se refieren a preparaciones de proteínas plasmáticas derivadas del plasma conjuntado de donadores adultos. Los anticuerpos IgG predominan; están presentes otras subclases de anticuerpos,

como IgA e IgM. La inmunoglobulina terapéutica puede proporcionar inmunización pasiva al aumentar los niveles de suero del receptor de anticuerpos circulantes. Los anticuerpos IgG pueden, por ejemplo, enlazar a y neutralizar toxinas bacterianas; opsonizar patógenos; activar complemento; y suprimir citoquinas patógenas y fagocitos a través de la interacción con citoquinas y receptores de éstos, como CD5, interleuquina-1a (IL-1a), interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis de tumor-alfa (TNF-alfa), y receptores de células T. Las inmunoglobulinas terapéuticas pueden inhibir la actividad de autoanticuerpos. Preparaciones de inmunoglobulina también incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulina intravenosa (IGIV), inmunoglobulina IV, inmunoglobulina terapéutica. Las preparaciones de inmunoglobulina son bien conocidas, e incluyen nombres comerciales, como BayGam®, Gamimune®N, Gammagard® S/D, Gamma®-P, Iveegam®EN, Panglobulin®, Polygam®S/D, Sandoglobulin®, Venoglobulin®-1, Venoglobulin®-S, WinRho®SDF y otros. Las preparaciones de inmunoglobulina pueden ser derivadas de plasma humano, o ser producidas de manera recombinante.

Como se usa en la presente enfermedades o condiciones tratables con IG se refiere a cualquier enfermedad o condición para la cual son usadas las preparaciones de inmunoglobulina. Dichas enfermedades y

condiciones incluyen, pero no se limitan a, cualquier enfermedad en la cual un incremento en anticuerpos circulantes es mejoradora, como, por ejemplo, inmunodeficiencia, hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); Síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada ANCA positiva; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células embrionarias hemopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatías para-proteinémicas de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia de mioclonus opsoclonus; pénfigus foliáceo; pénfigus vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de choque tóxico; enfermedad de

Alzheimer; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

Como se usa en la presente, régimen de dosificación se refiere a la cantidad de inmunoglobulina administrada y a la frecuencia de administración. El régimen de dosificación es una función de la enfermedad o condición a ser tratada, y por consiguiente puede variar.

Como se usa en la presente, "sustancialmente el mismo que un régimen de dosificación intravenosa de IG (IVIG)", se refiere a un régimen en el cual la dosis y/o la frecuencia está en una cantidad que es efectiva para tratar una enfermedad o condición particular, típicamente es de aproximadamente 0 10 %, de la dosis o frecuencia IV. Cantidades de IVIG que son efectivas para tratar una enfermedad o condición particular son conocidas o pueden ser determinada empíricamente por un experto en el arte. Por ejemplo, como se ejemplifica posteriormente, 300 mg/kg (es decir 21 gramos asumiendo los pesos del adulto promedio de 70 kg) a 600 mg/kg (es decir 42 gramos) es la dosis mensual típica de IVIG administrada a pacientes que tienen enfermedades por inmunodeficiencia. Por lo tanto, IG, cuando se administra en combinación con hialuronidasa, es administrada subcutáneamente a dosis que son o son

aproximadamente 300 mg/kg a 600 mg/kg para el tratamiento de enfermedades por inmunodeficiencia primaria.

Como se usa en la presente, frecuencia de administración se refiere al tiempo entre dosis sucesivas de inmunoglobulina. Por ejemplo, frecuencia puede ser una, dos, tres, cuatro semanas, y es una función de la enfermedad o condición particular tratada. Generalmente, frecuencia es al menos cada dos o tres semanas, y típicamente no mas de una vez al mes.

Como se usa en la presente, hialuronidasa se refiere a una enzima que degrada el ácido hialurónico. Hialuronidasa incluye hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos, y crustáceos (EC 3.2.1.36), y hialuronidasas de tipo de mamífero (EC 3.2.1.35). Hialuronidasas también incluye cualquiera de origen no humano incluyendo, pero no limitándose a, roedor, canino, felino, leprino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, de peces, de ranas, bacteriano, y de sanguijuelas, otros parásitos, crustáceos. Hialuronidasas no humanas ejemplares incluyen, hialuronidasas de vacas (SEC ID NO: 10 y 11), avispa social del género vespa (SEC ID NOS: 12 y 13), abeja de miel (SEC ID NO: 14), avispón de cara blanca (SEC ID NO: 15), avispa papelera (SEC ID NO: 16), ratón (SEC ID NOS: 17-19, 32), cerdo (SEC ID NOS: 20-

21), rata (SEC ID NOS: 22-24,31), conejo (SEC ID NO: 25), oveja (SEC ID NO: 26 y 27), orangután (SEC ID NO: 28), mono cynomolgus (SEC ID NO: 29), cobayo (SEC ID NO: 30), *Staphylococcus aureus* (SEC ID NO: 33), *Streptococcus pyogenes* (SEC ID NO: 34), *y Clostridium perfringens* (SEC ID NO: 35). Las hialuronidasas también incluyen las de origen humano. Las hialuronidasas humanas ejemplares incluyen HYAL1 (SEC ID NO: 36), HYAL2 (SEC ID NO: 37), HYAL3 (SEC ID NO: 38), HYAL4 (SEC ID NO: 39), y PH20 (SEC ID NO: 1). También están incluidas entre las hialuronidasas las hialuronidasas solubles, incluyendo PH20 ovina y bovina, PH20 humana soluble y rHuPH20 soluble.

La referencia a hialuronidasas incluye polipéptidos de hialuronidasa precursores y polipéptidos de hialuronidasa maduros (como aquellos en los cuales una ha sido retirada una secuencia de señal), formas truncadas de éstos que tengan actividad, e incluye las variantes alélicas y especies variantes, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 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 SEC ID NOS: 1 y 10-39, o con la forma madura de éstos. Por ejemplo, la referencia ala hialuronidasa también incluye

variantes del polipéptido precursor de PH20 humana expuestas en las SEC ID NOS: 50-51. Las hialuronidasas también incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o post-traslacionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o post-translacionales. Dichas modificaciones incluye, pero no se limitan a, PEGilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en el arte.

Como se usa en la presente, una hialuronidasa soluble se refiere a un polipéptido caracterizado por su solubilidad bajo condiciones fisiológicas. Las hialuronidasas solubles pueden ser diferenciadas , por ejemplo, por su separación en la fase acuosa de una solución de Triton X-114 calentada a 37 °C (Bordier y colaboradores, (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7). Fijadas a membrana, como hialuronidasas fijadas en lípido, se separarán en la fase rica en detergente, pero se separarán en la fase acuosa o pobre en detergente después de tratamiento con Fosfolipasa-C. Se incluyen entre las hialuronidasas solubles las hialuronidasas fijadas a membrana en las cuales una o más regiones asociadas con la fijación de la hialuronidasa a la membrana ha sido removida o modificada, donde la forma soluble retiene la actividad hialuronidasa. Las hialuronidasas solubles incluyen

hialuronidasas solubles recombinantes y aquellas contenidas en o purificadas a partir de fuentes naturales, como por ejemplo, extractos de testículo de oveja o vaca. Son ejemplares de hialuronidasas solubles la PH20 humana soluble. Otras hialuronidasas solubles incluyen PH20 ovina (SEC ID NO: 27) y bovina (SEC ID NO: 11).

Como se usa en la presente, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluye los polipéptidos maduros que carecen de todos o de una porción del sitio de fijación de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el terminus-C de modo que a partir de la expresión los polipéptidos son solubles. Polipéptidos de sHuPH20 ejemplares incluyen polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC D NOS: 4-9 47-48. Los polipéptidos precursores para dichos polipéptidos de sHuPH20 ejemplares incluyen una secuencia de señal. Son ejemplos de precursores aquellos expuestos en las SEC ID NOS: 3 y 40-46, cada uno de los cuales contiene una secuencia de señal de 35 aminoácidos en las posiciones de los aminoácidos 1-35. Los polipéptidos de HuPH20 soluble también incluyen aquellos degradados durante o después de los métodos de producción y de purificación descritos en la presente.

Como se usa en la presente, PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20) se refiere a una forma

soluble de PH20 humana que es expresada recombinantemente en células de Ovario de Cobayo (Hámster Chino) (CHO, siglas del inglés Chinese Hamster Ovary). La rHuPH20 soluble es codificada por el ácido nucleico que incluye la secuencia de señal y es expuesta en la SEC ID NO: 49. También se incluyen moléculas de ADN que son variantes alélicas de éstas y otras variantes. El ácido nucleico que codifica a rHuPH20 soluble es expresado en células de CHO, las cuales secretan el polipéptido maduro. Como se produjo en el medio de cultivo hay heterogeneidad en el terminus-C de modo que el producto incluye una mezcla de especies que puede incluir una cualquiera o más de las SEC ID NOS: 4-9 en varias abundancias. También se incluyen las variantes alélicas correspondientes y otras variantes, incluyendo aquellas correspondientes a polipéptidos de PH20 humano precursor expuestas en las SEC ID NOS: 50-51. Otras variantes pueden tener 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEC ID NOS: 4-9 y 47-48 mientras que retienen una actividad hialuronidasa y son solubles.

Como se usa en la presente, actividad, se refiere a una actividad o actividades funcional(es) de un polipéptido o porción de éste asociada con una proteína de extensión total (completa). Las actividades funcionales incluyen, pero no se

limitan a, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (habilidad para enlazar o competir con un polipéptido para enlazar a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, habilidad para formar multímeros, y la habilidad para enlazar específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

Como se usa en la presente, actividad hialuronidasa se refiere a la habilidad de la hialuronidasa para fragmentar el ácido hialurónico. Ensayos in vitro para determinar la actividad hialuronidasa de hialuronidasas, como rHuPH20 soluble, son conocidos en el arte y se describen en la presente. Ensayos ejemplares incluyen el ensayo de microturbidez descrito posteriormente (véase por ejemplo, el Ejemplo 3) que mide la fragmentación del ácido hialurónico por hialuronidasa indirectamente por medio de la detección del precipitado insoluble formado cuando ácido hialurónico sin fragmentar enlaza con albúmina de suero.

Como se usa en la presente, los residuos de α-aminoácidos como se encuentran de manera natural son los residuos de 20 α-aminoácidos encontrados en la naturaleza, los cuales son incorporados en proteínas por medio del reconocimiento específico de la molécula de tARN cargada con su codón de mARN análogo en humanos.

Como se usa en la presente, los ácidos nucleicos

incluyen ADN, ARN y análogos de éstos, incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (PNA, siglas del inglés Peptide Nucleic Acids) y mezclas de éstos. Los ácidos nucleicos pueden ser de una sola hebra o de doble hebra. Cuando nos referimos a sondas o cebadores, los cuales son opcionalmente marcadas, como con un marcador detectable, como un marcador fluorescente o radiomarca, se contemplan moléculas de una sola hebra. Dichas moléculas son típicamente de una extensión tal que su objetivo es estadísticamente único o de bajo número de copias (típicamente menos de 5, generalmente menos de 3) para sondear o cebar una biblioteca. Generalmente una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas o cebadores pueden ser de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de largo.

Como se usa en la presente, un péptido se refiere a un polipéptido que es desde 2 a 40 aminoácidos de extensión.

Como se usa en la presente, los aminoácidos que se encuentran en las varias secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente son identificados de conformidad con sus abreviaciones de una letra o de tres letras conocidas (Tabla 1). Los nucleótidos que se encuentran en varios fragmentos de ácido nucleicos son designados con la designación de tres letras individuales estándar usada

rutinariamente en el arte.

Como se encuentra en la presente, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los propósitos de la presente, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos que se encuentran de manera natural, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en donde el carbono alfa tiene una cadena lateral).

Como se usa en la presente, "residuo de aminoácido", se refiere a un aminoácido formado a partir de la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus ligaduras peptídicas. Los residuos de aminoácido descritos en la presente se asume que están en la forma isomérica "L". Los residuos en la forma isomérica "D", los cuales son designados así, pueden ser sustituidos por cualquier residuo de aminoácido-L mientras que la propiedad funcional deseada sea retenida por el polipéptido. NH_2, se refiere al grupo amino libre presente en el terminus amino de un polipéptido. COOH, se refiere al grupo carboxi libre presente en el terminus carboxi de un polipéptido conservando la nomenclatura de polipéptidos estándar descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y adoptada 37 C.F.R., §§ 1.821-1.822, las abreviaciones para los residuos de aminoácidos se muestran en

la Tabla 1:

Tabla 1- Tabla de Correspondencia

SIMBOLO		
1-Letra	3-Letras	Aminoácido
y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Acido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptofano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Acido aspártico

366

Tabla 1 (Continuación)

SIMBOLO		
1-Letra	3-Letras	Aminoácido
N	Asn	Asparagina
B	Asn	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

Se hace debe hacer notar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en la presente por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del termuinus-amino al terminus-carboxilo. Además, la frase "residuo de aminoácido" es definida ampliamente para incluir los aminoácidos enlistados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y modificada y aminoácidos inusuales, como los mencionados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, e incorporados a la presente como referencia. Además, se hace notar que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos, a un grupo amino terminal como NH2 o a un grupo

carboxilo terminal como COOH.

Como se usa en la presente, "aminoácidos como se encuentran de manera natural", se refiere a los 20 L-aminoácidos que se encuentran en polipéptidos.

Como se usa en la presente, "aminoácidos no naturales", se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura similar a un aminoácido natural pero ha sido modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Por consiguiente, los aminoácidos que no se encuentran de manera natural incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos que se encuentran de manera natural e incluyen, pero no se limitan a, los D-isoestereómeros de aminoácidos. Se describen aminoácidos no naturales ejemplares en la presente y son conocidos por los expertos en el arte.

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

Como se usa en la presente, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN más grande que tiene

atributos específicos. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica a un polipéptido específico es una porción de una molécula de ADN más larga, como un plásmido o un fragmento de plásmido, el cual cuando se lee desde la dirección 5' a 3', codifica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido específico.

Como se usa en la presente, el término "polinucleótido" significa un polímero de una o de doble hebra de desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos bases leídas desde el extremo 5' a 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden ser aislados desde fuentes naturales, sintetizados in vitro, o preparados desde una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La extensión de una molécula de polinucleótido se da en la presente en términos de nucleótido (abreviado "nt") o pares base (abreviado "pb"). El término nucleótidos es usado para moléculas de una sola o de doble hebra donde lo permita el contexto. Cuando el término es aplicado a moléculas de doble hebra, es usado para denotar extensión total y se comprenderá que es equivalente al término pares base. Los expertos en el arte reconocerán que las dos hebras de un polinucleótido de doble hebra pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos de éstas pueden estar desplazados; así todos los nucleótidos en una molécula de polinucleótido de doble hebra pueden no estar

emparejados. Dichos extremos disparejos, en general, no excederán de 20 nucleótidos de extensión.

Como se usa en la presente "similaridad" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la conexión entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o de las secuencias de los ácidos nucleicos del nucleótido. Similarmente peden basarse en el grado de identidad y/o homología de secuencias de residuos y de los residuos contenidos en ellas.

Los expertos en el arte conocen métodos para evaluar el grado de similaridad entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método de evaluar la similaridad de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos son alienadas en una manera que produzca un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "identidad", se refiere a la medida en la cual las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos son invariables. La alineación de secuencias de aminoácidos y en algún grado de secuencias de nucleótidos, también puede tomar en cuenta diferencias conservadoras y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Diferencias conservadoras son aquellas que preservan las propiedades físico-químicas del residuo involucrado. Las alineaciones pueden ser generales (alineación de las secuencias comparadas sobre la extensión entera de las

secuencias y que incluye todos los residuos) o local (la alineación de una porción de las secuencias que incluye solamente la región o regiones más similares.

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

Como se usa en la presente, "homólogo" (con respecto a secuencias de ácidos nucleicos y/o de aminoácidos) significa aproximadamente mayor que o igual a 25 % de homología de secuencia, típicamente mayor que o igual a 25 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de homología de secuencia; el porcentaje preciso puede ser especificado si

es necesario. Para los propósitos de la presente los términos "homología" e "identidad" a menudo, son usados indistintamente, a menos que se indique de otra manera. En general, para determinación del porcentaje de homología o identidad; las secuencias son alineadas de modo que se obtenga el máximo orden de parejas (véase, por ejemplo, Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., Eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereaux, J., Eds., M. Stockton Press, New York, 1991; Carillo y colaboradores (1988) SIAM J. Applied Math. 48: 1073). Por "homología de secuencia", el número de aminoácidos conservados es determinado por medio de programas de algoritmos de alineación estándar, y pueden ser usados con penalidades de espacios de faltantes establecidos por cada proveedor. Moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente homólogas hibridizarían típicamente a severidad moderada o a severidad alta a todo lo largo de la extensión del ácido nucleico de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones

372

degenerados en lugar de los codones en la molécula de ácido nucleico hibridizante.

Ya sea que cualquiera de dos moléculas tenga secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que sean al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % "idénticas u "homólogas", esto puede ser determinado usando algoritmos de cómputo conocidos, como el programa "FASTA", usando por ejemplo, los parámetros faltantes como en Pearson y colaboradores (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (otros programas incluyen el programa paquete GCG (Devereaux, J., y colaboradores, Nucleics Acids Research 12 (I): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. y colaboradores, J. Molec. Biol. 215: 403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo y colaboradores (1988) SIAM J. Applied Math 48: 1073). Por ejemplo, puede usarse la función BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information para determinar la identidad. Otros programas disponibles pública o comercialmente incluyen el programa DNAStar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa "Gap" del University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) (Madison WI). El por ciento de homología o de identidad de moléculas de proteínas y/o de ácidos nucleicos puede ser determinado, por ejemplo, por comparación de la información

de secuencia usando un programa de cómputo GAP (por ejemplo, Needleman y colaboradores (1970) J. Mol. Biol. 48¨443, revisado por Smith y Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482). Resumiendo, el programa GAP define similaridad como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, divididos entre el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias.. Los parámetros faltantes para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contenga un valor de 1 para identidades y 0 para no-identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gibskov y colaboradores (1986) Nucl. Acids. Res. 14: 6745, como se describió por Schwartz y Dayhoff, Eds. ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pág. 353-358 (1979); (2) una penalidad de 3.0 ara cada espacio y una penalidad adicional de 0.10 para cada símbolo en cada espacio; y (3) ninguna penalidad para espacios terminales.

Por consiguiente, como se usa en la presente, el término "identidad" u "homología, representa una comparación entre un polinucleótido o polipéptido de prueba y uno de referencia. Como se usa en la presente, el término al menos "90 % idéntico a", se refiere a por ciento de identidades desde 90 a 99.99 en relación a la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de referencia. Identidad a un nivel de 90 % o

más es indicador del hecho que, suponiendo para propósitos de ejemplificación que sean comparados un polipéptido de prueba y uno de referencia de 100 aminoácidos de extensión. No más de 10 % (es decir, 10 afuera de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de prueba difieren de los del polipéptido de referencia. Pueden hacerse comparaciones similares entre polinucleótidos de prueba y de referencia. Dichas diferencias pueden ser representadas como mutaciones puntuales aleatoriamente distribuidas sobre la extensión total de un polipéptido o pueden estar aglomerados en una o más localizaciones de extensión variable hasta el máximo permisible, por ejemplo, diferencia de 10/100 aminoácidos (aproximadamente 90 % de identidad). Las diferencias son definidas como sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Al nivel de homologías o identidades superiores a 85 - 90 %, el resultado deberá ser independiente del programa y grupo de parámetros de espacios; dichos altos niveles de identidad pueden ser evaluados fácilmente, a menudo por alineación manual sin confiar en el "software".

Como se usa en la presente, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similaridad y/o identidad) para alinear las posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos. Típicamente, son alienadas

dos o más secuencias que están relacionadas en 50 % o más de identidad. Un grupo de secuencias alineadas se refiere a 2 o más secuencias que están alineadas en posiciones correspondientes y pueden incluir secuencias que se alinean derivadas de ARNs, y otra cADNs, alienadas con secuencia de ADN genómico.

Como se usa en la presente, "cebador", se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como un punto de iniciación de síntesis de ADN dirigida hacia el modelo bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, en la presencia de cuatro trifosfatos de nucleósidos diferentes y un agente de polimerización, como ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa en sentido contrario) en un regulador apropiado y a una temperatura adecuada. Se apreciará que ciertas moléculas de ácidos nucleicos pueden servir como una "sonda" y como un "cebador". Un cebador, no obstante, tiene un grupo hidroxilo en 3' por extensión. Un cebador puede ser usado en una variedad de métodos, incluyendo, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcriptasa en sentido contrario (RT)-PCR, ARN PCR, LCR, PCR multiplex, PCR con enclave, PCR de captura, PCR de expresión, 3' y 5'RACE, PCR in situ, PCR- mediada por ligadura y otros protocolos de amplificación.

Como se usa en la presente, "par cebador" se

refiere a un grupo de cebadores que incluyen un cebador 5' (de 5' a 3') que hibridiza con el extremo 5' de una secuencia a ser amplificada (por ejemplo, por PCR y un cebador 3' (de 3' a 5') que hibridiza con el complemento del extremo 3' de la secuencia a ser amplificada.

Como se usa en la presente, "específicamente hibridiza", se refiere a fortalecimiento, por emparejamiento con la base complementaria, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) a una molécula de ácido nucleico objetivo. Los expertos en la materia están familiarizados con parámetros in vitro e in vivo que afectan la hibridización específica, como longitud y composición de la molécula particular. Parámetros particularmente relevantes para hibridización *in vitro* incluyen adicionalmente temperatura de lavado y de fortalecimiento, composición reguladora y concentración de sales. Condiciones de lavado ejemplares para remover moléculas de ácido nucleico enlazadas no específicamente a alta severidad son =.1 x SSPE, 0.1 % de SDS, 65 °C, y a severidad media son 0.2 SSPE, 0.1 % de SDS, 50 °C. Condiciones de severidad equivalente son conocidas en el arte. El experto en la materia puede ajustar fácilmente estos parámetros para lograr hibridización específica de una molécula de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico objetivo apropiada para una aplicación particular.

377

Complementarias cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridizar, típicamente con menos de 25 %, 15 % o 5 % de desigualdades entre nucleótidos opuestos. Si es necesario, el porcentaje de complementaridad será especificado. Típicamente, las dos moléculas son seleccionadas de modo que hibridizarán bajo condiciones de alta severidad.

Como se usa en la presente, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar de modo que la propiedad de interés es suficientemente sin cambio de modo que el producto sustancialmente idéntico puede ser usado en lugar del producto.

Como se usa en la presente, también se comprende que los términos "sustancialmente idéntico" o "similar" varian con el contexto como comprenderán los expertos en el arte relevante.

Como se usa en la presente, una variante alélica o variaciones alélicas, referencias a cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Variación alélica surge naturalmente mediante una mutación, y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico en poblaciones. La mutación genética, puede ser silenciosa (sin cambio en el polipéptido codificado) o puede

codificar polipéptidos que tengan que tengan secuencia de aminoácido alterada. El término "variante alélica" también es usado en la presente para denotar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. Típicamente, la forma de referencia del gen codifica una forma salvaje y/o forma predominante de un polipéptido a partir de una población o elemento de referencia individual de una especie. Típicamente, variantes alélicas, las cuales incluyen variantes entre y mezclado con especies que tienen típicamente al menos 80 %, 90 % o más identidad de aminoácidos con una forma predominante y/o de tipo salvaje de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y de si la comparación es inter-especies o intra-especies. Generalmente, variantes alélicas intra-especies tienen al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad o mayor con una forma predominante o de tipo salvaje, incluyendo 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad con una forma predominante o de tipo salvaje de un polipéptido. La referencia a una variante alélica en la presente generalmente se refiere a variaciones en proteínas entre elementos de la misma especie.

Como se usa en la presente, "alelo", el cual es usado indistintamente en la presente con "variante alélica", se refiere a formas alternativas de un gen o porciones de

éste. Los alelos ocupan el mismo locus o posición sobre cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homozigótico para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterozigótico para el gen. Alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un nucleótido individual o en varios nucleótidos, y pueden incluir sustituciones, eliminaciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

Como se usa en la presente, especies variantes, se refiere a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, como ratón y humano.

Como se usa en la presente, una variante de empalme, se refiere a una variante producida por medio de diferente procesamiento de un trascripto primario de ADN genómico que da como resultado más de un tipo de mARN.

Como se usa en la presente, modificación, es una referencia a modificación de una secuencia de aminoácidos o de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácidos nucleicos e incluye eliminaciones, inserciones, y reemplazos de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Los métodos para modificar un polipéptido

son rutinarios para los expertos en el arte, como usando metodologías de ADN recombinante.

Como se usa en la presente, el término promotor significa una porción de un gen que contiene secuencias de ADN que se proporciona para el enlace de ARN polimerasa e iniciación de trascripción. Las secuencias promotoras son comúnmente, pero no siempre, encontradas en la región no codificadora 5′ de genes.

Como se usa en la presente, proteína o polipéptido purificado o aislado o porción de éstos biológicamente activa está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido desde el cual se ha derivado la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando es sintetizada químicamente. Se puede determinar que las preparaciones son sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables determinado por medio de los métodos estándares de análisis, tales como cromatografía en capa fina (TLC, siglas del inglés Thin Layer Chromatography), electroforesis sobre el y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, siglas del inglés High Performance Liquid Chromatography), usados por los expertos en el arte para evaluar dicha pureza, o suficientemente pura de modo que la purificación adicional no alteraría de manera

detectable las propiedades físicas y químicas, como las actividades biológicas y enzimáticas, de la sustancia. Los métodos de purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente puros químicamente son conocidos pro los expertos en el arte. Un compuesto sustancialmente puro químicamente, no obstante, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En dichos casos, la purificación adicional debe incrementar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las cuales la proteína es separada de los componentes celulares de las células a partir de las cuales es aislada o producida recombinantemente. En una modalidad, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de proteínas no enzimáticas) (también mencionadas en la presente como una proteína contaminante), generalmente menos de aproximadamente 20 % de proteínas no enzimáticas o 10 % de proteínas no enzimáticas o menos de aproximadamente 5 % de proteínas no enzimáticas. Cuando la proteína enzimática es producida recombinantemente, está también sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente o en 20 %, 10 % o 5 % del volumen de

la preparación de proteína enzimática.

Como se usa en la presente, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas enzimáticas en las cuales la proteína es separada de precursores químicos u otros productos químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas enzimáticas que tengan menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) 20 %, 10 %, 5 % o menos de precursores químicos o componentes o productos químicos no enzimáticos.

Como se usa en la presente, "sintético", con referencia a, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico sintético o un gen sintético o un péptido sintético, se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula de péptido que es producida por medio de métodos recombinantes y/o por medio de métodos de síntesis química.

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

Como se usa en la presente, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que son usados para introducir un ácido nucleico heterólogo en células ya sea para expresión

o bien para replicación de éste. Los vectores típicamente permanecen episomales, pero pueden ser diseñados para efectuar la integración de un gen o de una porción de éste en un cromosoma del genoma. También están contemplados vectores que son cromosomas artificiales, como cromosomas artificiales de levaduras y cromosomas artificiales de mamíferos. La selección y el uso de dichos vehículos son bien conocidos por el experto en el arte.

Como se usa en la presente, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que están operativamente ligados con secuencias reguladoras, 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 opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un mejorador, una señal de poliadenilación, y los similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de ADN plásmido o viral, o pueden contener elementos de ambos. Por consiguiente, un vector de expresión se refiere a una construcción de ARN o ADN recombinante, como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, desde la introducción en una célula huésped apropiada da como resultado la expresión de un ADN clonado. Los vectores de

expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en el arte e incluyen aquellos que son replicables en células eucarióticas y/o células procarióticas y aquellos que permanecen episomales o aquellos que se integran en el genoma de la célula huésped.

Como se usa en la presente, vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales". Vectores virales son virus diseñados que están ligados operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzadores) los genes exógenos al interior de las células.

Como se usa en la presente, operable u operativamente ligado cuando se refiere a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan en concierto para sus propósitos previstos, por ejemplo, la transcripción inicia en el promotor y procede a través del segmento que codifica al terminador.

Como se usa en la presente, el término evaluar está previsto para incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteasa, o de un dominio de ésta, presente en la muestra, y también de obtener un índice, proporción, porcentaje, valor visual u otro indicador del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y la especie química actualmente detectada no

necesita ser, por supuesto, producto de la proteólisis misma, sino que puede por ejemplo, ser un derivado de ésta o de alguna sustancia adicional. Por ejemplo, la detección de un producto de fragmentación de una proteína de complemento, como por SDS-PAGE y tinción proteínica con azul de Coomasie.

Como se usa en la presente, actividad biológica se refiere a las actividades in vivo de un compuesto o a respuestas fisiológicas que resultan después de la administración in vivo de un compuesto, composición u otra mezcla. Actividad biológica, por consiguiente, abarca efectos terapéuticos y actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden ser observadas en sistemas in vitro diseñados para probar o usar dichas actividades. Por consiguiente, para propósitos de la presente un ensayo biológico de una proteasa es su actividad catalítica en la cual es hidrolizado un polipéptido.

Como se usa en la presente equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican a la misma secuencia de aminoácidos o a proteínas equivalentes. Cuando equivalente es usado haciendo referencia a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con

solamente 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 el mismo grado (por ejemplo, dos péptidos pueden exhibir diferentes velocidades del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades son usualmente de manera sustancial las mismas.

Como se usa en la presente, "modular" y "modulación" o "alterar", se refieren a un cambio de una actividad de una molécula, como una proteína. Actividades ejemplares incluyen, pero no se limitan a, actividades biológicas, como una señal de transducción. Modulación puede incluir un incremento en la actividad (es decir, sobre-regulación o actividad agonista) una disminución en la actividad (es decir sub-regulación o inhibición) o cualquier otra alteración en una actividad (como un cambio en periodicidad, frecuencia, duración, cinética u otros parámetros). Modulación puede ser contexto dependiente, y típicamente modulación, se compara a un estado determinado, por ejemplo, proteína de tipo salvaje, la proteína en un estado constitutivo, o la proteína como se expresa en una condición o tipo celular determinado.

Como se usa en la presente, una composición se refiere a cualquier mezcla. Si puede ser una solución,

suspensión, líquido, polvo, pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de éstas.

Como se usa en la presente, una combinación se refiere a cualquier asociación entre o mezcla de dos o más artículos. La combinación puede ser de dos o más artículos separados, como dos composiciones o dos colecciones, puede ser una mezcla de éstos, como una mezcla individual de los dos o más artículos, o cualquier variación de éstos. Los elementos de una combinación están generalmente, de manera funcional asociados o relacionados.

Como se usa en la presente, un equipo es una combinación empacada que opcionalmente incluye otros elementos, como reactivos e instrucciones adicionales para uso de la combinación o elementos de ésta.

Como se usa en la presente, "enfermedad o trastorno", se refiere a una condición patológica en un organismo resultante de causa o condición que incluye, pero no se limita a, infecciones, condiciones adquiridas, condiciones genéticas, y caracterizada por síntomas identificables. Enfermedades y trastornos de interés en la presente son aquellas que son tratables por medio de inmunoglobulina.

Como se usa en la presente, "tratar" a un sujeto con una enfermedad o condición significa que los síntomas del

sujeto son aliviados total o parcialmente, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por consiguiente, tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. Profilaxis se refiere a prevención de una enfermedad potencial y/o prevención del empeoramiento de los síntomas o progreso de una enfermedad. Tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de una preparación de inmunoglobulina y composiciones proporcionadas en la presente.

Como se usa en la presente, un agente efectivo farmacéuticamente, incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, incluyendo, pero no limitándose a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes dispersantes, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo fármacos de moléculas pequeñas y proteínas terapéuticas.

Como se usa en la presente, tratamiento significa cualquier manera en la cual los síntomas de una condición, trastorno o enfermedad u otra indicación, son mejorados o de otra manera alterados benéficamente.

Como se usa en la presente "efecto terapéutico" significa un efecto resultante del tratamiento de un sujeto que altera, típicamente beneficia o mejora los síntomas de una enfermedad o condición o que cura una enfermedad o condición. Una cantidad efectiva terapéuticamente se refiere

a la cantidad de una composición, molécula o compuesto que da como resultado un efecto terapéutico después de administración a un sujeto.

Como se usa en la presente, el término "sujeto", se refiere a un animal, incluyendo un mamífero, como un ser humano.

Como se usa en la presente, un paciente se refiere a un sujeto humano.

Como se usa en la presente, mejoramiento de los síntomas de una enfermedad o trastorno particular por medio de un tratamiento, como por administración de una composición farmacéutica u otro agente terapéutico, se refiere a cualquier aminoración ya sea permanente o temporal, que dure o transitorio, de los síntomas que pueden ser atribuidos a o asociados con la administración de la composición o agente terapéutico.

Como se usa en la presente, prevención o profilaxis, se refiere a métodos en los cuales el riesgo de desarrollar la enfermedad o condición se reduce.

Como se usa en la presente, "una cantidad efectiva terapéuticamente" o "una dosis efectiva terapéuticamente", se refiere a la cantidad de un agente, compuesto, material, o composición que contenga un compuesto que sea al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Por

consiguiente, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

Como se usa en la presente, forma de dosis unitaria, se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas para sujetos humanos y animales y empacados individualmente como es sabido en el arte.

Como se usa en la presente, una formulación en dosificación individual se refiere a una formulación para administración directa.

Como se usa en la presente, un "artículo de fabricación" es un producto que es elaborado y comercializado. Como se usa en el transcurso de esta solicitud, el término está previsto para abarcar composiciones de IG y hialuronidasa contenidas en artículos de empaque.

Como se usa en la presente, fluido se refiere a cualquier composición que pueda fluir. Por consiguiente fluidos abarca composiciones que están en la forma de semi-sólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones.

Como se usa en la presente "equipo" se refiere a una combinación de composiciones proporcionadas en la presente y otro artículo para un propósito que incluye, pero

no se limita a, activación, administración, diagnóstico, y evaluación de una propiedad o actividad biológica. Los equipos opcionalmente incluyen instrucciones para uso.

Como se usa en la presente, un extracto o lisado celular, se refiere a una preparación o fracción que es elaborada a partir de una célula lisada o disruptada.

Como se usa en la presente, animal incluye cualquier animal, tal como, pero no se limita a primates, incluyendo humanos, gorilas y monos; roedores, como ratones y ratas; aves, como pollos; rumiantes, como cabras, vacas, ciervos, ovejas; ovinos, como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen humanos como el animal contemplado. Las enzimas proporcionadas en la presente son de cualquier fuente, animal, vegetal, procarióticas y fúngicas. La mayoría de las enzimas son de origen animal, incluyendo de origen mamífero.

Como se usa en la presente, un control, se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de prueba, excepto que no está tratada con un parámetro de prueba, o , si es una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no afectado con la condición de interés. Un control, también puede ser un control interno.

Como se usa en la presente, las formas singulares "un, una" (antes de consonante) y "un, una" (antes de vocal)

y "el, la, los, las" incluyen referentes del plural, a menos que el contexto dicte de otra manera. Por consiguiente, por ejemplo, la referencia a un compuesto que comprende "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

Como se usa en la presente, intervalos y cantidades pueden ser expresados como "aproximadamente" un valor o un intervalo particular: aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por consiguiente "aproximadamente 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

Como se usa en la presente "opcional" u "opcionalmente", significa que el evento o circunstancia descritos subsecuentemente ocurre o no, y que la descripción incluye casos donde dicho evento o circunstancia tiene lugar y casos donde no. Por ejemplo, un grupo sustituido opcionalmente significa que el grupo es sustituido o no sustituido.

Como se usa en la presente, las abreviaciones para cualquiera de los grupos protectores, aminoácidos y otros compuestos, son, a menos que se indique de otra manera, de conformidad con su uso común, abreviaciones reconocidas, o la IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (véase, (1972) Biochem. 11: 1726).

B. ADMINISTRACION SUBCUTANEA DE INMUNOGLOBULINA

(IG)

Se proporcionan en la presente métodos y usos de tratar enfermedades y condiciones tratables con IG por administración subcutánea de inmunoglobulina (IG) en combinación con una hialuronidasa soluble. Por consiguiente, también se proporcionan combinaciones de IG y una hialuronidasa soluble. En virtud de la habilidad de la hialuronidasa para desintegrar el ácido hialurónico en la matriz extracelular, la hialuronidasa facilita la infusión subcutánea de agentes terapéuticos. La inmunoglobulina es un agente terapéutico que es primeramente dado por administración intravenosa para tratar individuos con deficiencias inmunes, mencionada como terapia IVIG. La biodisponibilidad de IG en la presencia de hialuronidasa es mayor que 90 % de la biodisponibilidad de IG después del tratamiento IVIG. Por consiguiente, en los métodos y usos proporcionados en la presente, la terapia en combinación de hialuronidasa e IG permite la administración subcutánea de inmunoglobulina a dosificaciones y frecuencias que son similares al tratamiento IVIG. Así, por ejemplo, en los métodos y usos proporcionados en la presente, IG, cuando se administra subcutáneamente en la presencia de hialuronidasa soluble, puede ser administrada una vez mensualmente a dosis de IVIG eficaces para la indicación particular.

Adicionalmente, porque la hialuronidasa actúa para abrir canales de flujo en la piel puede acelerar la velocidad de infusión. Por consiguiente, métodos de administrar subcutáneamente IG co-formulada y/o co-administrada con hialuronidasa incrementan las velocidades de infusión, y disminuye así el tiempo de liberación de la terapia con IG.

La formación de anticuerpos defectuosos es la anormalidad más común en la mayoría de las enfermedades por inmunodeficiencia primaria (PID, siglas del inglés Primary Inmunodeficiency Diseases); se refleja más a menudo por una disminución en las inmunoglobulinas del suero, lo cual a su vez conduce a susceptibilidad creciente a infecciones bacterianas, especialmente del tracto sinopulmonar. Los niveles disminuidos de inmunoglobulina son encontrados en individuos que tienen defectos de anticuerpos como agamaglobulinemia congénita o relacionada con el cromosoma X, eliminaciones de la cadena pesada de inmunoglobulina, deficiencia de la subclase de inmunoglobulina G selectiva (IgG), inmunodeficiencia variable común, o síndrome de hiperinmunoglobulina M relacionada con rayos X. Los niveles de inmunoglobulina abatidos también son encontrados en individuos que tienen inmunodeficiencias combinadas debido a defectos en las células B y T, tal, como, pero no se limita a, inmunodeficiencia combinada severa o Síndrome de Wiskott

Aldrich (IUIS Scientific Committee, 1999).

Individuos con estas deficiencias requieren terapia de reemplazo con productos de inmunoglobulina para prevenir o reducir la severidad de infecciones. Inicialmente, la terapia de reemplazo de inmunoglobulina fue dada por la ruta intramuscular, pero a principios de 1981 la abrumadora mayoría de pacientes ha sido tratada por la ruta intravenosa (IV). Corrientemente, la mayoría de los productos de inmunoglobulina en los Estados Unidos son para administración IV. Sin embargo, las preparaciones de inmunoglobulina han sido desarrolladas más recientemente para administración subcutánea (Gardulf y colaboradores (2006) Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 6: 434-42; Gardulf y colaboradores (2006) J. Clin. Immunol., 26: 265-73). Al menos un producto, Vivaglobin®, es aprobado para administración subcutánea.

Todas las preparaciones de inmunoglobulina usadas actualmente son formuladas al 16 %, en comparación con preparaciones IVIG formuladas al 5 a 12 %. Concentración más alta en relación a preparaciones IV permiten volúmenes de infusión más pequeños; dichas preparaciones no pueden ser infusionadas intravenosamente. Dichos métodos subcutáneos de terapia de reemplazo de inmunoglobulina se consideran efectivos, seguros y también muy apreciados por pacientes para tener un bajo riesgo de reacciones adversas

generalizadas y conduce a mínimos más altos en concentraciones de IgG en suero en comparación con infusiones IV mensuales (Gardulf y colaboradores (1995)) J. Adv. Nurs., 21: 917-27; Gardulf y colaboradores (1993) Clin. Exp. Immunol., 92: 200-4; Gardulf y colaboradores (1991) Lancet, 338: 162-6).

La biodisponibilidad de inmunoglobulina administrada subcutáneamente generalmente es menor que la infusionada intravenosamente. La inmunoglobulina está disponible inmediatamente en la sangre, y se equilibra lentamente en el compartimento extra-vascular durante 3 a 5 días (Schiff y colaboradores (1986) J. Clin. Immunol., 6: 256-64). La inmunoglobulina administrada subcutáneamente es absorbida lentamente desde el espacio subcutáneo en la sangre y al mismo tiempo se equilibra con el compartimento extra-vascular; no hay picos IV altos. La biodisponibilidad no ha sido estudiada extensivamente, pero en un ensayo reciente de la preparación de ZLB-Behring (es decir Vibaglobin®), se determinó por medición del área bajo la curva (AUC) que solamente 67 % de la inmunoglobulina fue absorbida y por consiguiente, la dosis recomendada fue de 137 % de la dosis IV (Ochs y colaboradores (2006) J. Clin. Immunol., 26: 265-73). A pesar de las dificultades técnicas de comparar el AUC por dos rutas y frecuencias de administración diferentes,

estudios de inmunoglobulina administrada intradérmicamente en conejos sugieren que has biodisponibilidad disminuida a través de la ruta subcutánea. Esto puede ser debido al modo de absorción de moléculas de proteína grandes, las cuales no pueden difundirse fácilmente a través de las paredes capilares y deben ser absorbidas vía los vasos linfáticos (Supersaxo y colaboradores (1990) Pharm. Res., 7: 167-9).

Además de problemas con la biodisponibilidad asociados con la administración subcutánea de IG, la desventaja primaria de la administración SC es que solamente pequeños volúmenes pueden ser infusionados en cada sitio, necesitándose el uso de sitios múltiples sobre una base semanal o bisemanal (por otra semana). Generalmente, usando una solución al 16 %, aproximadamente 20 mL pueden ser infusionados por sitio; y paciente adulto que recibe 400 mg/kg de peso corporal (PC)) requeriría así al menos 3 sitios por semana o 12 sitios por mes. Aunque a la administración semanal o bisemanal se ha añadido la ventaja de mantener mejor los niveles mínimos que por infusiones IV mensualmente, los requerimientos de inserciones múltiples de agujas ha sido desanimante para muchos pacientes.

El espacio SC está formado por una retícula de colágeno llena con una sustancia similar a un gel, ácido hialurónico. El ácido hialurónico es reemplazado con una vida

media de aproximadamente 5 horas, y es ampliamente responsable por la resistencia a fluir del fluido a través de los tejidos. La hialuronidasa temporalmente digiere el ácido hialurónico, facilitando así infusiones en el espacio subcutáneo. El ácido hialurónico es restaurado en 24 horas, no dejando cambios observables. Por consiguiente, debido a la habilidad de la hialuronidasa para abrir canales en el espacio intersticial a través de la degradación de glicosaminoglicanos, la administración de una hialuronidasa soluble permite la difusión de moléculas, mejorando así la biodisponibilidad, las características farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de dichas moléculas co-formuladas y co-administradas.

En algunos ejemplos, la biodisponibilidad de IG co-administrada subcutáneamente con hialuronidasa es 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de la biodisponibilidad de IVIG. Típicamente, la biodisponibilidad es mayor que 90 %. Adicionalmente, la co-administración con una hialuronidasa soluble permite la infusión de grandes volúmenes en un solo sitio subcutáneo. Por ejemplo, volúmenes de hasta 600 mL o mayores de IG pueden ser administrados en un solo sitio en una sola sesión, por ejemplo 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, o más pueden ser administrados en un solo sitio en una administración

individual. Así, una preparación de IG formulada en o entre 5 - 12 % puede ser co-administrada subcutáneamente con una hialuronidasa soluble a dosificaciones equivalentes para dosis IVIG una vez al mes, por ejemplo, a o aproximadamente 100 mg/kg, 200 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg, 500 mg/kg, 600 mg/kg o más. Las dosificaciones pueden ser administradas como una dosis única o pueden ser divididas en dosis múltiples dadas diaria o semanalmente, como una vez a la semana, o cada dos, tres o cuatro semanas o combinaciones de éstas. Por consiguiente, al administrar IG subcutáneamente en la presencia de una hialuronidasa soluble, una o todas las consideraciones y problemas asociados con la administración subcutánea de IG son resueltos. Así, en virtud de las propiedades de dispersión de hialuronidasa, administrar subcutáneamente IG en la presencia de una hialuronidasa soluble permite la administración de dosis IVIG a frecuencias de IVIG una vez 1 mes, mientras que se mantiene la biodisponibilidad de IVIG.

Las siguientes secciones describen inunoglobulinas ejemplares y hialuronidasas solubles en las combinaciones de la presente, métodos de elaborarlas, y usarlas para tratar enfermedades y condiciones tratables con IG.

C. Inmunoglobulina

Se proporcionan en la presente inmunoglobulinas

(IG, también mencionadas como gama globulinas o IgG) que pueden ser usadas para administración subcutánea en combinación con una hialuronidasa soluble. IG actúa para fortalecer el sistema inmune por modulación de la actividad de complemento, suprimir la producción de auto-anticuerpos, saturar o bloquear a los receptores de Fc sobre macrófagos y linfocitos B, y suprimir la producción de mediadores inflamatorios como citoquinas, quimioquinas y metaloproteinasas.

IG es una fracción proteínica encontrada en el plasma de animales superiores y contiene un gran número de anticuerpos que tienen especificidades variables. Generalmente, IG contiene inmunoglobulinas de suero que pueden ser cualquier idiotipo, como IgG y varias subclases, IgA, IgM, IgD, IgE. Las varias inmunoglobulinas o subclases pueden estar presentes a varias concentraciones y especificidades, las cuales pueden diferir entre preparaciones de inmunoglobulinas dependiendo, por ejemplo, sobre la exposición de los donadores de plasma a antígenos (por ejemplo, por medio de vacunaciones). A menudo, las inmunoglobulinas están presentes en cantidades normalmente encontradas en el suero (véase la Tabla 2), aunque pueden emplearse etapas de purificación para alterar las proporciones de clases o subclases de inmunoglobulinas

particulares. Típicamente, preparaciones de IG contienen 90 % o más IgG, como 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de IgG. Las inmunoglobulinas pueden ser policlonales o monoclonales. Típicamente, las preparaciones incluyen un alto porcentaje de IgG monomérica y un bajo contenido de IgA.

TABLA 2: Inmunoglobulina de Suero

Clase Ig	Nivel en suero, mg/ml (%)	Función
IgG	1200(77)	Ig importante en humanos
IgA	200(13)	Protege la mucosa
IgM	150(9)	Ig importante para respuestas inmune primarias
IgD	2(<1)	Regula las células B
IgE	<1(trazas)	Ig importante en respuestas alérgicas

Las inmunoglobulinas pueden ser aisladas a partir de sangre animal o humana o producida por tros medios, por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante o tecnología del hibridoma. Por ejemplo, las inmunoglobulinas pueden ser obtenidas a partir de tejidos, cultivos de hibridoma de linfocitos, suero o plasma de sangre, o cultivos celulares recombinantes usando cualquier procedimiento de fraccionamiento adecuado, por ejemplo, precipitaciones en medio alcohólico o separaciones por intercambio iónico. En

general, IG es preparada a partir de plasma sanguíneo por fraccionamiento en medio alcohólico, como se empleó originalmente por Cohn y lo modificó por Oncley (el método de Cohn-Oncley, véase, por ejemplo, Cohn y colaboradores (1946) J. Am. Chem. Soc. 68: 459-475; Oncley y colaboradores (1949) J. Am. Chem. Soc., 71:541-550). El uso de alcohol en la purificación puede inactivar virus potencialmente contaminantes. El método de Cohn - Oncley puede dar como resultado proteínas aglomeradas y desnaturalizadas, las cuales pueden dar como resultado formas de alto peso molecular que pueden actuar como complejos antígeno-anticuerpo que tengan la capacidad para fijar libremente el complemento.

Para prevenir dichos efectos indeseables, los métodos de Cohn-Oncley modificados han sido desarrollados para la preparación y purificación de IG. Varios de dichos procedimientos son conocidos y pueden ser adaptados y modificados para uso de las preparaciones de IG de la presente. Está en la experiencia del arte preparar preparaciones de IG en vista de los métodos detallados conocidos y disponibles en el arte. Típicamente, IG es fabricada usando fraccionamiento primario de etanol en frío y un fraccionamiento secundario que puede incluir cualquiera de una o más modificaciones químicas, incubación a pH de 4.0 con

o sin pepsina, precipitación con PEG, cromatografía por intercambio iónico, fraccionamiento enzimático, tratamiento con detergente como solvente y diafiltración y ultrafiltración.

Por ejemplo, la separación de aglomerados de IG por medio de técnicas convencionales como ultra-centrifugación o cromatografía por exclusión, hace posible obtener un producto que tenga una actividad anti-complementaria baja. Otros métodos de preparación de IG incluyen, pero no se limitan a, un proceso para fraccionar plasma humano por medio de polímeros de etilenglicol (Polson y colaboradores (1964) Biochim. Biophys. Acta, 82: 463-475); incorporación de un polietilenglicol (PEG) como un agente de purificación iniciando a partir de un material separado desde el fraccionamiento de Cohn (fracción II o II + III, véase, por ejemplo, Las Patentes U.S. Nos. 4,093,606 y 4,165,370); y otros métodos similares de procesos de purificación con polietilenglicol (EP 0246579). Además, se han descrito procesos para obtener IG que exhiben baja actividad anticomplemento por tratamiento con enzimas como pepsina, plasmina, tripsina inmovilizada, tratamiento a un pH ácido moderado, tratamiento con propiolactona-B, métodos de fraccionamiento que usan polietilenglicol como un agente de precipitación, y otras técnicas descritas en las Patentes

U.S. Nos. 4,093, 4,126,605, 3,966,906, y 4,124,576. Otros procesos están basados en modificar química y parcialmente las moléculas de IG tratándolas con agentes reductores, alcoholización, alquilación y sulfonación (véase por ejemplo, la Patente U.S. 6,875,848). La cromatografía por intercambio iónico puede ser usada para eliminar contaminantes indeseables de los materiales iniciales usados para obtener las preparaciones de IG (véase por ejemplo, la Patente U.S. No. 3,869,436, EP 91300790 y WO 94/29334). EP0440483 describe una combinación de técnicas útiles para facilitar la preparación intravenosa de del producto basado en cromatografía por intercambio iónico y diafiltración a un pH de ácido débil. También se describen en el arte otros métodos y son conocidos por el experto en el arte (véase por ejemplo, la Patente U.S. 5,177,194 y 6,875,848).

Las preparaciones de IG deberán ser tratadas para remover la carga viral. Hay dos métodos para disminuir la carga viral: inactivación viral y separación o remoción viral. Ejemplos de métodos de inactivación viral incluyen, pero no se limitan a, fraccionamiento en frío con etanol, calentamiento (pasteurización), medio ácido y detergente/solvente (bajo pH). Por ejemplo los procesos con solvente/detergente han demostrado tener acción virucida contra VSV (virus de la estomatitis vesicular), virus de

Sindbis, VIH, VHB (virus de la hepatitis B) y VHC (virus de la hepatitis C). Ejemplos de remoción y separación viral incluyen, pero no se limitan a, fraccionamiento en frío con etanol, separación de fase o precipitación con polietilenglicol, cromatografía por afinidad, cromatografía por exclusión sobre gel o por intercambio iónico, y filtración.

La formulación purificada final también debe de ser preparada para evitar aglomeración excesiva y para estabilizar la proteína. La aglomeración de la preparación de IG puede ser minimizada preparando preparaciones liofilizadas para estabilidad mejorada en almacenamiento, para reconstitución con un diluyente antes de uso. Otra manera de incrementar la estabilidad de preparaciones de IG que es bien conocida en el arte es la adición de excipientes estabilizantes de proteínas a la preparación de IG. Los excipientes conocidos incluyen, pero no se limitan a, azúcares, polioles, aminoácidos, aminas, sales, polímeros y tensoactivos. Por ejemplo, la Patente U.S. 4,499,073 describe la estabilización por medio de la selección de pH y de la fuerza iónica; La Patente JP 54020124, describe la adición de un aminoácido a una preparación intramuscular para volver su almacenamiento estable y seguro; Las Patentes JP 57031623 y JP 57128635 describen el uso de arginina y/o lisina con NaCl

en preparaciones al 5 a 10 % de IG para lograr estabilidad a largo plazo en una preparación intramuscular; JP 4346934 describe el uso de baja conductividad (menos de mmho), pH de 5.3 a 5.7 y opcionalmente uno o más estabilizantes incluyendo PEG, albúmina de suero humano y manitol; U. S. 4,439,421 expone la adición de una macromolécula hidrofílica, un poliol y otra proteína para estabilizar contra la generación anti-complemento; U. S. 5,945,098 describe la estabilización si soluciones isotónicas por la adición de aminoácidos glicina 0.1 a 0.3 M) y detergentes no-iónicos (polisorbato y PEG); U.S. 4,186,192 describe varios aditivos que incluyen aminoácidos; WO 2005/049078 describe la estabilización con maltosa y adicionalmente glicina a 0.1 M; U.S. 4,362,661 describe el uso de aminoácidos básicos o neutros para impartir estabilidad sobre preparaciones al 5 % de IG. También pueden prepararse formulaciones líquidas estables, que usan carbohidratos en un medio acuoso que tenga una fuerza iónica muy baja y un pH de 4.25 (patente U.S. No. 4,396,608) o un pH de ácido débil de 5-6 (EP 0278422).

También puede controlarse la formación de dímeros de preparaciones de IG. Por ejemplo, la Patente U.S. No. 5,871,736 describe preparaciones de IG, particularmente preparaciones líquidas, que contienen uno o más estabilizantes anfifílicos a fin de estabilizar contra la

formación de dímeros. Los estabilizantes anfifílicos incluyen ácido nicotínico y sus derivados, en particular nicotinamida, y principalmente conjuntamente con lo anterior, aminoácidos que tengas cadenas laterales lipofílicas sin carga, por ejemplo, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina, prolina y valina.

Las preparaciones pueden ser preparadas por medio de métodos conocidos en el arte, como se describe en la presente. No obstante, generalmente, el pH de la preparación final es ajustado a un pH relativamente alto pero ácido, es decir en el intervalo de aproximadamente un pH de 4.2 a 5.4, como un pH en el intervalo de 4.6 a 5.1. Se encontró que este intervalo de pH es particularmente útil para mejorar el almacenamiento de preparaciones de IG.

Generalmente, preparaciones de IG finales tienen una concentración de proteína de aproximadamente 5 a 25 % en peso/volumen. Generalmente de 6 a 15 % en peso/volumen, 8 a 12 en peso/volumen, y típicamente 10 % en peso/volumen. La concentración final de proteínas dependerá de varios factores, como la ruta de administración, el paciente a ser tratado, y el tipo de condición a ser tratada.

En la presente se contempló que cualquier preparación de IG usada para administración IV puede ser usada en los métodos proporcionados en la presente en

combinación con una hialuronidasa soluble para administración subcutánea. La preparación incluye formulaciones líquidas y liofilizadas. La inmunoglobulina (IVIG) está comercialmente disponible como Carimune® NF, Flebogamma® 5%, Gammagard® Liquid, Gammagard® S/D, Gamunex®, Iveegam® EN, Octagam® y Polygam® S/D. Típicamente, dichas preparaciones usan todas un método de fraccionamiento en frío en medio alcohólico, pero usan diferentes métodos para aislar y purificar la inmunoglobulina y diferentes métodos para reducir la contaminación potencial con virus. Adicionalmente, otras preparaciones actualmente formuladas para administración intramuscular o subcutánea pueden ser usadas en las combinaciones y métodos proporcionados en la presente.

Ejemplar de una preparación de Ig es Inmuno Globulina Intravenosa (Humana), al 10 % (IVIG, 10 % comercializada como Gammagard® líquido, Baxter Healthcare Corporation), el cual es una preparación de IgG no modificada líquida con una distribución de subclases de IgG similar a la de plasma normal. La preparación contiene el fragmento cristalizable intacto (Fc) y regiones Fab. Las preparaciones contienen 100 mg/mL de proteínas, con al menos 98 % de IgG; IgA está presente a una concentración de 37 µg/mL IgM está presente solamente en cantidades en trazas. Tiene una osmolalidad que es similar a la osmolalidad fisiológica y no

contiene azúcares, sodio o conservadores añadidos. Está formulada con glicina para estabilización a un pH de 4.6 a 5.1. El proceso de fabricación emplea un procedimiento de fraccionamiento en frío en medio alcohólico de Cohn-Oncley modificado y purificación adicional por un proceso continuo mediante el uso de cromatografía por intercambio catiónico débil y cromatografía por intercambio aniónico débil. El proceso de fabricación también incluye 3 etapas de remoción o de inactivación viral independientes; tratamiento con solvente/detergente (S/D), nanofiltración e incubación a un pH bajo y temperatura elevada.

D. Hialuronidasa

Se proporcionan en la presente combinaciones que contienen inmunoglobulina y una hialuronidasa soluble, y métodos de usar dichas combinaciones para administración subcutánea para el tratamiento de enfermedades y condiciones mediadas por IG. Las hialuronidasas son una familia de enzimas que degradan el ácido hialurónico, el cual es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente importante del protector intersticial. Al catalizar la hidrólisis del ácido hialurónico, un constituyente importante del protector intersticial, hialuronidasa, baja la viscosidad del ácido hialurónico, incrementando así la permeabilidad del tejido. Como tal la

hialuronidasa ha sido usada, por ejemplo, como un agente dispersante o impartidor de untuosidad conjuntamente con otros agentes, fármacos y proteínas para mejorar su dispersión y liberación. Hialuronidasas ejemplares en las combinaciones y métodos proporcionados en la presente son las hialuronidasas solubles.

Hay tres clases generales de hialuronidasas; hialuronidasa de mamífero, hialuronidasa bacteriana y hialuronidasa de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos. Las hialuronidasas de tipo de mamífero (EC 3.2.1.35) son endo-β-N-acetil-hexoaminidasas que hidrolizan al enlace β1→4 glicosídico de hialuronano en varias extensiones de oligosacárido como tetrasacáridos y hexasacáridos. Ambos tienen actividades hidrolítica y transglicosidasa, y pueden degradar hialuronano y sulfatos de condroitina (CS), generalmente C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas de vacas (vacunas) (SEC ID NOS: 10 y 11), ratón (SEC ID NOS: 17-19, 32), cerdo (SEC ID NOS: 20-21), rata (SEC ID NOS: 22-24, 31), conejo (SEC ID NO: 25), oveja (ovina) (SEC ID NOS: 26 y 27), orangután (SEC ID NO: 28), mono cynomolgus (SEC ID NO: 29), cobayo (SEC ID NO: 30), y hialuronidass humanas.

Las hialuronidasas de mamífero pueden ser adicionalmente subdivididas en aquellas que son de neutro-

activas, predominantemente encontradas en extractos de testículos, y ácido-activas, predominantemente encontradas en órganos como el hígado. Las hialuronidasas neutro-activas ejemplares incluyen PH20, que incluyen pero no se limitan a, PH20 derivado de diferentes especies como ovina (SEC ID NO: 27), bovina (SEC ID NO: 11) y humana (SEC ID NO: 1). La PH20 humana (también conocida como SPAM1 o PH20 de proteína de superficie espermática), está generalmente enclavada en la membrana plasmática vía una fijación glicosilfosfatidil inositol (GPI, siglas del inglés GlycosylPhosphatidyl Inositol). Está naturalmente involucrada en la adhesión huevo-esperma y ayuda a la penetración por el esperma de la capa de células de cúmulo al digerir el ácido hialurónico. El mARN trasncripto de PH20 es normalmente transladado para generar un polipéptido precursor de 509 aminoácidos (SEC ID NO: 1) que contiene una secuencia de señal de 35 aminoácidos en el terminus-N (posiciones de los residuos de aminoácido 1-35) y una fijación GPI de 19 aminoácidos en el terminus-C (posiciones de los residuos de aminoácidos 491-509). El PH20 maduro es, por consiguiente, un polipéptido de 474 aminoácidos expuestos en la SEC ID NO: 2). PH20 bovino es un polipéptido precursor de 553 aminoácidos (SEC ID NO: 11). La alineación del PH20 bovino con el PH20 humano muestra solamente débil homología, con múltiples espacios que existen

desde el aminoácido 470 hasta el respectivo termini carboxi debido a la ausencia de una fijación GPI en el polipéptido bovino (véase por ejemplo, Frost GI (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4: 427-440). De hecho, ninguna fijación GPI clara es predicha en cualquier especie de PH20 junto a las humanas.. Por consiguiente, los polipéptidos de PH20 producidos a partir de ovinos y bovinos existen como formas solubles. Aunque la PH20 bovina existe muy débilmente fijada a la membrana plasmática, no está fijada vía una fijación sensible a fosfolipasa La Lancette y colaboradores, Biol. Reprod. Agosto de 2001; 65(2): 628-36). Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima hialuronidasa de testículos bovinos soluble como un extracto para uso clínico (Wydase™, Hyalase™). Junto a PH20 humana (también denominada SPAM1), se han identificado en el genoma humano cinco genes similares a hialuronidasa, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y HYALP1. HYALP1 es un pseudogen, y HYAL3 (SEC ID NO:38) no ha mostrado poseer actividad enzimática hacia cualquiera de los sustratos conocidos. HYAL4 (polipéptido precursor expuesto en la SEC ID NO: 39) es una condroitinasa y exhibe poca actividad hacia hialuronano. HYAL1 (polipéptido precursor expuesto en la SEC ID NO: 36) es la enzima ácido-activa prototípica y PH20 (polipéptido precursor expuesto en la SEC ID NO: 1) es la enzima neutro-activa prototípica.

413

Hialuronidasas ácido-activas, como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor expuesto en la SEC ID NO: 37) generalmente carecen de actividad catalítica a pH neutro (es decir pH de 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica in vitro a pH superior a 4.5 (Frost y colaboradores (1997) Anal. Biochemistry, 251: 263-269). HYAL2 es una encima ácido-activa con una actividad específica muy baja in vitro. Las enzimas similares a hialuronidasas pueden también caracterizarse por aquellas que están generalmente enclavadas a la membrana plasmática vía una fijación glicosilfosfatidil inositol como HYAL2 humana y PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, y colaboradores (2003) Proc Natl Acad Sci USA. 100 (8):4580-5), y aquellas que son generalmente solubles como la HYAL1 humana (Frost y colaboradores, (1997) Biochem Biophys Res Commun.:236(1):10-5).

La glicosilación, incluyendo glicosilación N- y O-ligada, de algunas hialuronidasas puede ser muy importante para su estabilidad y actividad catalítica. Aunque altera el tipo de glicano que modifica a una glicoproteína, puede tener efectos sobre una anteginicidad de la proteína, pliegue estructural, solubilidad, y estabilidad, no se piensa que la mayoría de las enzimas requieran glicosilación para óptima actividad enzimática. Dichas hialuronidasas son únicas a este respecto, porque la remoción de la glicosilación N-ligada

G14

puede dar como resultado la inactivación casi completa de la actividad hialuronidasa. Para dichas hialuronidasas la presencia de glicanos N-ligados es crítica para generar una enzima activa.

Oligosacáridos N-ligados caen en varios tipos importantes (oligomanosa, compleja, híbrida, sulfatada), todas las cuales tienen núcleos (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc fijados vía el nitrógeno de la amida de residuos Asn que caen en las secuencias Asn-Xaa-Thr/Ser- (donde Xaa no es Pro). La glicosilación en un sitio Asn-Xaa-Cys ha sido reportada para la proteína C de coagulación. En algunos casos , la hialuronidasa puede contener ambos enlaces N-glicosídico y O-glicosídico. Por ejemplo, PH20 tiene oligosacáridos O-ligados así como también oligosacáridos N-ligados.

Hay siete sitios potenciales de glicosilación N-ligados en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humana ejemplificados en la SEC ID NO: 1. se forman enlaces disulfuro entre los residuos cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 para formar el dominio hialuronidasa central. No obstante, se requieren cisteínas adicionales en el terminus carboxi para actividad catalítica de la enzima neutra de modo que los aminoácidos 36 a 464 de la SEC ID NO: 1 contienen el dominio hialuronidasa de PH20 humana mínimamente activa. Por consiguiente, el sitio N-490 de glicosilación N-ligada no se

415

requiere para actividad hialuronidasa apropiada.

Hialuronidasa Soluble

Se proporcionan en las combinaciones y métodos de la presente hialuronidasas solubles. Las hialuronidasas solubles incluyen cualquiera que exista en forma soluble, incluyendo, pero no limitándose a, HYAL1, PH20 bovina y PH20 ovina, variantes alélilas de éstas y otras variantes. También están incluidas entre las hialuronidasas cualquier hialuronidasa que haya sido modificada para ser soluble. Por ejemplo, PH20 humana, la cual normalmente está enclavada a membrana vía una fijación GPI, puede hacerse soluble por truncado de y remoción de toda o una porción de la fijación GPI en el terminus C. Las hialuronidasas solubles también incluyen hialuronidasas neutro-activas y ácido-activas, no obstante, las hialuronidasas neutro-activas son contempladas en la presente para propósitos de administración subcutánea.

Así, es ejemplar de hialuronidasa soluble PH20 de cualquier especie, como cualquiera de las expuestas en las SEC ID NOS: 1, 2, 11, 25, 27, 30 y 31, o formas truncadas de éstas que carecen de toda o una porción de la fijación GPI C terminal, mientras que la hialuronidasa sea soluble y retenga la actividad hialuronidasa. También se incluyen entre las hialuronidasas solubles las variantes alélicas u otras variantes de cualquiera de las SEC ID NOS: 1, 2, 11, 25, 27,

30 y 31, o formas truncadas de éstas. Las variantes alélilas y otras variantes son conocidas pro los expertos en el arte, e incluyen polipéptidos que tengan 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEC ID NOS: 1, 2, 11, 25, 27, 30 y 31 o formas truncadas de éstas.

Típicamente, para uso en los métodos de la presente se usó una PH20 humana soluble. Aunque puede utilizarse PH20 de otros animales, dichas preparaciones son potencialmente inmunogénicas, ya que son proteínas animales. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demostraron sensibilidad secundaria previa a la ingesta de alimentos, y ya que éstas son proteínas animales, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización subsecuente. Por consiguiente, preparaciones no humanas pueden no ser adecuadas para uso crónico. Si se desean preparaciones no humanas, se contempló en la presente que dichos polipéptidos puedan ser preparados para tener inmunogenicidad reducida. Dichas modificaciones están en el nivel de un experto en el arte. Las hialuronidasas, incluyendo PH20, usadas en los métodos de la presente pueden ser producidas recombinantemente o pueden ser purificadas o parcialmente purificadas a partir de fuentes naturales, como, por ejemplo, desde extractos de testículos.

PH20 Humana Soluble

Ejemplar de una hialuronidasa soluble es PH20 humana soluble. E han producido las formas solubles de PH20 humana recombinante y pueden ser usadas en los métodos descritos en la presente para co-administración o co-formulación con inmunoglobulina para administración subcutánea para tratar enfermedades y condiciones tratables con IG. La producción de dichas formas solubles de PH20 se describe en las Solicitudes Nos. 11/065,716 y 11/238,171, y en los Ejemplos 2 - 6 posteriores. Las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera que tenga truncaciones C terminales para generar polipéptidos que contengan los aminoácidos 1 al aminoácido 347, 372, 394, 413, 430, 447, 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 1. Cuando se expresa en células de mamífero la secuencia de señal de 35 aminoácidos N terminales es fragmentada durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína es secretada. Así, los polipéptidos solubles maduros contienen los aminoácidos 36 a 347, 372, 394, 413, 430, 447, 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de la SEC ID NO: 1. Los mutantes finales por eliminación en la posición del aminoácido 477 a 483 (correspondientes al polipéptido precursor expuesto en la SEC ID NO: 1) exhiben mayor actividad hialuronidasa secretada

que la forma enclavada en GPI de extensión total. Por lo tanto, ejemplares de hialuronidasas solubles son aquellas que son de 442, 443, 444, 445, 446 y 447 aminoácidos de extensión, como se expone en las SEC ID NOS: 4-9, o variantes alélicas o de especies u otras variantes de éstas. Generalmente, formas solubles de PH20 son producidas usando sistemas de expresión de proteínas que facilitan la N-glicosilación correcta para asegurar que el polipéptido retenga actividad, ya que la glicosilación es importante para la actividad catalítica y la estabilidad de las hialuronidasas. Dichas células incluyen, por ejemplo células de ovario de cobayo (CHO) (por ejemplo, células DG44 de CHO).

PH20 Recombinante Humana Soluble (rHuPH20)

Se han generado las formas solubles recombinantes de PH20 humana (rHuPH20 soluble) y pueden ser producidas y purificadas usando los métodos descritos en la presente. La generación de dichas formas solubles de rHuPH20 se describe en la Solicitud de Patente U.S. Nos. 11/065,716 y 11/238,171 (publicadas como solicitudes de patentes publicadas U.S. Nos. US 2005/0260186 y US 2006/0104968), y en los Ejemplos 2-6 posteriores. Ejemplares de dichos polipéptidos son aquellos generados a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica a los aminoácidos 1-482 expuestos en la SEC ID NO: 3. El procesamiento post-translacional remueve la secuencia

de señal de 35 aminoácidos, dando como resultado la secreción de una rHuPH20 soluble de 447 aminoácidos (SEC ID NO: 4). La rHuPH20 purificada resultante puede ser heterogénea debido a peptidasas presentes en el medio de cultivo, después de la producción y purificación. Típicamente, rHuPH20 es producida en células que facilitan la N-glicosilación correcta para retener la actividad, como células CHO (por ejemplo células DG44 de CHO).

E.Métodos de Producir Acidos Nucleicos que Codifican a una Hialuronidasa Soluble y a Polipéptidos de Esta

Pueden obtenerse polipéptidos de una hialuronidasa soluble expuesta en la presente por medio de métodos bien conocidos en el arte por purificación de proteínas y expresión recombinante de proteínas. Puede usarse cualquier método conocido por los expertos en el arte para identificación de ácidos nucleicos que codifican a genes deseados. Cualquier método disponible en el arte puede ser usado para obtener un clon de ADN genómico o de cADN de extensión total (es decir, que abarca la región codificadora entera) que codifica a una hialuronidasa, como desde una fuente de célula o de tejido. Las hialuronidasas solubles variantes o modificadas, pueden ser diseñadas a partir de un polipéptido de tipo salvaje, como por mutagénesis en sitio

puntual.

Los polipéptidos pueden ser clonados o aislados usando cualquier método conocido en el arte para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Dichos métodos incluyen amplificación por PCR de ácidos nucleicos y cribado de bibliotecas, incluyendo cribado por hibridización de ácido nucleico, cribado basado en anticuerpos y cribado basado en actividad.

Pueden usarse métodos para amplificación de ácidos nucleicos para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican a un polipéptido deseado, incluyendo, por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un material que contiene ácido nucleico puede ser usado como un material inicial desde el cual puede ser aislada una molécula de ácido nucleico que codifica al polipéptido. Por ejemplo, pueden usarse en métodos de amplificación, preparaciones de ADN y de mARN, extractos celulares, extractos de tejido, muestras de fluido (por ejemplo, sangre, suero, saliva), muestras de sujetos saludables y/o enfermos. Pueden usarse bibliotecas de ácidos nucleicos como una fuente de material inicial. Los cebadores pueden ser diseñados para amplificar a un polipéptido deseado. Por ejemplo, los cebadores pueden ser diseñados basados en secuencias expresadas a partir de las cuales es generado un polipéptido deseado. Los cebadores

pueden ser diseñados basados en retro-translación de una secuencia de aminoácidos polipeptídicos. Moléculas de ácidos nucleicos generadas por amplificación pueden ser secuenciadas y confirmadas para codificar a un polipéptido deseado.

Moléculas de nucleótidos adicionales pueden ser unidas a una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido, incluyendo secuencias enlazadoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción para el propósito de clonar al en sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para la amplificación de secuencias de ADN que codifican al núcleo proteínico. Además, secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales pueden ser enlazadas operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido. Ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de la proteína intracelular, y secuencias de secreción, por ejemplo, secuencias de señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción proteínica. Dichas secuencias son conocidas por los expertos en el arte. Secuencias de residuos de nucleótidos adicionales como las secuencias de bases que indican regiones de enlace proteínico también pueden ser enlazadas a moléculas de ácido nucleico que codifican a una enzima. Dichas regiones

incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la captación de una enzima en células objetivo especificas, o de otra manera alteran la farmacocinética de un producto de un gen sintético. Por ejemplo, enzimas pueden ser enlazadas a porciones de PEG.

Además, pueden añadirse marcas u otras porciones, por ejemplo para ayudar en la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, secuencias de residuos de nucleótidos adicionales como secuencias de bases que indican una marca de epítope u otro marcador detectable también pueden ser enlazadas a moléculas de ácidos nucleicos que codifican a una enzima. Ejemplares de dichas secuencias incluyen secuencias de ácidos nucleicos que codifican a una marca His (por ejemplo, 6xHis, HHHHHH; SEC ID NO: 54) o Marca Señalizadora (DYKDDDDK; SEC ID NO: 55).

Los ácidos nucleicos aislados e identificados pueden entonces ser insertados en un vector de clonación apropiado. Pueden usarse numerosos sistemas de huésped-vector conocidos en el arte. Posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema del vector debe de ser compatible con la célula huésped usada. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos como derivados lambda, o plásmidos como pCMV4, pBR322 o

derivados del plásmido pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ejemplificado en la presente. La inserción en un vector de clonación puede, por ejemplo, lograrse ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tenga un termini cohesivo complementario. La inserción puede efectuarse usando vectores de clonación TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden ser modificados enzimáticamente. Alternativamente, cualquier sitio deseado puede ser producido ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) sobre el termini del ADN; estos enlazadores ligados pueden contener oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican a secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el vector fragmentado y el gen proteínico pueden ser modificados por adición de una cola homopolimérica. Pueden introducirse moléculas recombinantes en células huéspedes vía, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generen muchas copias de la secuencia del gen.

En modalidades específicas, la transformación de

células huéspedes con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen proteínico aislado, cADN, o secuencias de ADN sintetizado facilitan la generación de muchas copias del gen. Así, el gen puede ser obtenido en grandes cantidades por crecimiento de transformantes, aislamiento de las moléculas de ADN recombinante a partir de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperación del gen insertado a partir del ADN recombinante aislado.

1.Vectores y Células

Para expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, como cualquiera descrita en la presente, el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia del nucleótido que codifica a la proteína puede ser insertado en un vector de expresión adecuado, es decir un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y translación de la secuencia que codifica a la proteína insertada. Las señales translacionales y transcripcionales necesarias también pueden ser suministradas por el promotor nativo para genes enzimáticos, y/o sus regiones de flanqueo.

También se proporcionan vectores que contienen un ácido nucleico que codifica a la enzima. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células

incluyen células procarióticas y eucarióticas, y los vectores son cualquiera de los adecuados para uso en la presente.

Se porporcionan células procarióticas y eucarióticas, incluyendo células endoteliales, que contienen los vectores. Dichas células incluyen células bacterianas, células de levaduras, células de hongos, Archea, células vegetales, células de insectos y células animales. Las células son usadas para producir una proteína de ésta por crecimiento de las células anteriormente descritas bajo condiciones en las cuales es expresada la proteína codificada por la célula, y recuperando la proteína expresada. Para propósitos de la presente, por ejemplo, las enzimas pueden ser secretadas en el medio.

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido de la hialuronidasa soluble acoplado a la secuencia de señal heteróloga o nativa, así como también múltiples copias de éstos. Los vectores pueden ser seleccionados para expresión de la proteína enzimática en la célula o de modo que la proteína enzimática sea expresada como una proteína secretada.

Puede usarse una variedad de sistemas huésped-vector para expresar a la secuencia que codifica a la proteína. Estos incluyen pero nos e limitan a sistemas

celulares de mamíferos infectados con virus (por ejemplo, virus de la viruela, adenovirus u otros virus); sistemas celulares de insectos infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos como levaduras que contienen vectores de levaduras; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plásmido, o ADN cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en su fuerza y especificidades. Dependiendo del sistema huésped-vector usado, puede usarse cualquiera de los numerosos elementos de transcripción y translación.

Puede usarse cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en el arte para la inserción de fragmentos de ADN en un vector para construir vectores de expresión que contengan un gen quimérico que contenga las señales de control transcripcional/translacional apropiadas y secuencias que codifiquen a la proteína. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante in vitro y sintéticas y recombinantes in vivo (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican ala proteína, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de ésta, puede ser regulada por una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de ésta sean expresados en huésped transformado con la(s) molécula(s) de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas

puede ser controlada por medio de cualquier promotor/mejorador conocido en el arte. En una modalidad específica, el promotor no es nativo a los genes para una proteína deseada. Promotores que pueden ser usados incluyen pero no se limitan al promotor precoz de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal a lo largo de 3' del virus de sarcoma de Rous (Yamamoto y colaboradores Cell 22: 787-797 (1980)), el promotor quinasa timidina del herpes (Wagner y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneina (Brinster y colaboradores, Nature 296:39-42 (1982)); vectores de expresión procarióticos como el promotor β-lactamasa (Jay y colaboradores (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543) o el promotor tac (DeBoer y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); ver también "Usefull Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242:79-94 (1980)); vectores de expresión de vegetales que contienen el promotor nopalina sintetasa (Herrara-Estrella y colaboradores, Nature 303:209-213 (1984)) o el promotor 35S ARN del virus mosaico del coliflor (Garder y colaboradores, Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética bifosfato de ribulosa carboxilasa (Herrera-estrella y colaboradores, Nature 310:115-120

(1984)); elementos promotores a partir de levaduras y otros hongos como el promotor GAL4, el promotor alcohol deshidrogenasa, el promotor fosfoglicerol quinasa, el promotor fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional animal que exhiben especificidad de tejido y han sido usadas en animales transgénicos: región de control del gen de elastasa I que está activa en células acinares pancreáticas (Swift y colaboradores, cell 38: 639-646 (1984); Ormitz y colaboradores, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); Mac Donald, Hepatology 7:425-515 (1987)); región control del gen de insulina la cual está activa en células beta pancreáticas (Hanahan y colaboradores, Nature 315:115-122 (1985)), región de control del gen de inmunoglobulina la cual está activa en células linfoides (Grosschedln y colaboradores, Cell 38:647-658 (1984); Adams y colaboradores, Nature 318:533-538 (1985); Alexander y colaboradores, Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), región de control del virus de tumor mamario de ratón, la cual está activa en mastocitos, células linfoides, de seno y testiculares (Leder y colaboradores, Cell 45:485-495 (1986)9, región de control del gen de albúmina la cual está activa en hígado (Pinkert y colaboradores, Genes y Devel. 1:268-276 (1987)), región de control del gen de alfa-fetoproteína la cual está activa en hígado (KrumLauf y colaboradores, Mol.

Cell Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer y colaboradores, Science 235:53-58 (1987)), región de control del gen de alfa-1 antitripsina la cual está activa en hígado (Kelsey y colaboradores, Genes y Devel. 1:161-171 (1987)), región de control del gen de beta-globulina la cual está activa en células mieloides (Magram y colaboradores, Nature 315:338-340 (1985); Kollias y colaboradores, Cell 46:89-94 (1986)), región de control del gen de la proteína básica de mielina la cual está activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead y colaboradores, Cell 48:703-712 (1987)), región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina la cual está activa en el músculo esquelético (Shani, Nature 314:283-286 (1985)), y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrófica la cual está activa en gonadotrofos del hipotálamo (Mason y colaboradores, Science 234:1372-1378 (1986)).

En una modalidad específica, se usa un vector que contiene un promotor ligado operablemente a ácidos nucleicos que codifican a una proteína deseada, o a un dominio, fragmento, derivado u homólogo de ésta, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Vectores plásmidos ejemplares para transformación de células E. coli, incluyen, por ejemplo, los

vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también la literatura publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor Fago T5 (reconocido por ARN polimerasa de E. coli) y un doble módulo de represión del operador lac para proporcionar expresión de alto nivel, ligeramente regulada de proteínas recombinantes en *E. coli,* un sitio de enlace ribosómico sintético (RBS II) para translación eficiente, una secuencia que codifica a la marca 6Xhis, terminadores transcripcionales t_o y T_1, origen de replicación ColE1, y un gen de beta lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE facilitan la colocación de la marca 6xHis ya sea en el terminus N- o bien en el C- de la proteína recombinante. Dichos plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 los cuales proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres macros de lectura y se proporcionan para la expresión de proteínas marcadas con 6xHis N-terminalmente. Otros vectores plásmidos ejemplares para la transformación de células de E. coli, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase la Patente U.S. 4,952,496, disponible de NOVAGEN, Madison, WI; véase, también la literatura publicada por Novagen que describe el sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, el cual contiene el promotor T7lac, terminador T7, el operador lac de *E. coli* inducible, y el gen

represor lac, pET 12a-c, el cual contiene al promotor T7, terminador T7, y la señal de secreción ompT de E. coli; y pET 15b y pET 19b (NOVAGEN, Madison, WI), el cual contiene una secuencia líder His-Tag™ para uso en purificación con una columna de His y un sitio de fragmentación de trombina que permite la fragmentación después de purificación sobre la columna , la región promotora lac-T7 y el terminador T7.

Ejemplar de un vector para expresión de células de mamíferos es el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 fue derivado de la estructura principal del vector pCI (Promega). Contiene ADN que codifica al gen de resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un orígen de replicación FI, una región promotora/mejoradora precoz/inmediata de citomegalovirus (CMV), y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El vector de expresión también tiene un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) a partir del virus de ECMV (Clontech) y el gen de dihidrofoliato reductasa de ratón (DHFR).

2.Expresión

Los polipéptidos de hialuronidasa soluble pueden ser producidos por medio de cualquier método conocido por el experto en el arte incluyendo métodos in vivo e in vitro. Las proteínas deseadas pueden ser expresadas en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas

requeridas de las proteínas, como por ejemplo, necesarias para administración y tratamiento. Los huéspedes de expresión incluyen organismos procarióticos y eucarióticos como E. coli, levaduras, plantas, células de insectos, células de mamíferos, incluyendo líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los huéspedes de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas así como también los tipos de modificaciones post-translacionales que están presentes sobre la proteína expresada. La selección del huésped de expresión puede hacerse con base en estos y otros factores, como consideraciones de seguridad y reguladoras, costos de producción y la necesidad y métodos de purificación.

Muchos vectores de expresión están disponibles y son conocidos por los expertos en el arte y pueden ser usados para expresión de proteínas. La selección del vector de expresión será influenciado por la selección del sistema de expresión del huésped. En general, vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente mejoradores, señales translacionales, y señales de terminación translacional y transcripcional. Vectores de expresión que son usados para transformación estable típicamente tienen un marcador seleccionable que permite la selección y mantenimiento de las células transformadas. En

algunos casos, puede usarse un orígen de replicación para amplificar el número de copias del vector.

Polipéptidos de hialuronidasa soluble también pueden ser utilizados o expresados como fusiones proteínicas. Por ejemplo, puede generarse una fusión enzimática para añadir funcionalidad adicional a una enzima. Ejemplos de proteínas de fusión enzimática incluyen, pero no se limitan a fusiones de una secuencia de señal, una marca para localización, por ejemplo, una marca his o una marca myc, o una marca para purificación, por ejemplo, una fusión GST, y una secuencia para dirigir la secreción de la proteína y/o asociación de membrana.

a.Células Procarióticas

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 por los expertos en el arte. Los vectores de expresión para E. coli pueden contener promotores inducible, dichos promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que exhiban alguna toxicidad para las células huéspedes. Ejemplos de promotores inducibles incluyen al promotor lac, al promotor trp, al promotor tac híbrido, y a los promotores T7 y SP6 ARN y al promotor λPL regulado por

temperatura.

Proteínas, como cualquiera de las proporcionadas en la presente, pueden ser expresadas 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. Agentes reductores como ditiotreitol y β-mercaptoetanol y desnaturalizantes, tales como clorhidrato de guanidina y urea pueden ser usados para resolubilizar las proteínas. Un procedimiento alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias que proporcionan un ambiente oxidante y similar a la chaperonina y disulfuro isomerasas y pueden conducir a la producción de la proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder es fusionada a la proteína para ser expresada, la cual dirige a la proteína al periplasma. La líder es entonces removida por medio de peptidasas de señal en el interior del periplasma. Ejemplos de secuencias líder que tienen como objetivo el periplasma incluyen la líder pe1B del gen del pectato liasa y la líder derivada del gen de fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la dispersión de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de proteínas permite la purificación rápida y simple a partir del sobrenadante de cultivo. Proteínas que no son secretadas

pueden ser obtenidas a partir del periplasma por medio de lisis osmótica. Similar a la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y pueden usarse agentes desnaturalizantes y reductores para facilitar la solubilización y re-doblamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede influir los niveles de expresión y la solubilidad, típicamente se usan temperaturas entre 25 °C y 37 °C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por consiguiente, si las proteínas requieren glicosilación ara funcionar, la glicosilación puede ser añadida in vitro después de purificación a partir de células huéspedes.

b.Células de Levaduras

Levaduras como *Sacharomyces cerevisae, Schizosacharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Kluyveromyces lactis y Pichia pastoris* son levaduras huéspedes de expresión bien conocidas que pueden ser usadas para producción de proteínas, como cualquiera de las descritas en la presente. Las levaduras pueden ser transformadas con vectores de replicación episomales o por medio de integración cromosómica estable por recombinación homóloga. Típicamente, se usan promotores inducibles para regular la expresión genética. Ejemplos de dichos promotores incluyen los promotores de GAL1, GAL7 y GAL5 y de metalotioneína, como CUP1, AOX1 u otro

promotor de Pichia u otra levadura. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador seleccionable como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para selección y mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levaduras son a menudo solubles. La co-expresión con chaperoninas como Bip y la proteina disulfuro isomerasa puede mejorar los niveles de expresión y la solubilidad. Adicionalmente, proteínas expresadas en levaduras pueden ser dirigidas para secreción usando fusiones de péptidos de señal de secreción como la señal de secreción del factor-alfa del tipo conjugado a levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie celular de levaduras como el receptor de adhesión conjugado a Aga2p o la glucoamilasa de Arxula adeninivorans. Un sitio de fraccionamiento de proteasa como el Kex-2 proteasa, puede ser diseñado para remover las secuencias fusionadas a partir delos polipéptidos expresados como salen de la trayectoria de secreción. Las levaduras también son capaces de glicosilación en los motivos Asn-X-Ser/Thr.

c.Células de Insectos

Las células de insectos, particularmente usando expresión en baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos como polipéptidos de hialuronidasa. Las células de insectos expresan altos niveles de proteínas y son capaces

437

de la mayor parte de las modificaciones post-translacionales usadas por eucariotas superiores. Baculovirus tiene un intervalo de huéspedes restrictivo, lo cual mejora la seguridad y reduce las consecuencias reguladoras de la expresión eucariótica. Vectores de expresión típica usan un promotor para expresión de alto nivel como el promotor polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus usados comúnmente incluyen baculovirus como *Autographa californica*, virus de polihedrosis nuclear (AcNPV, siglas del inglés Autograpa californica Nuclear Polihedrosis Virus), y el *Bombyx mori* nuclear polihedrosis virus (BmNPV, siglas del inglés *Bombyx mori* Nuclear Polihedrosis Virus) y una línea celular de insectos como Sf9, derivada de *Spodoptera frugiperda, Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danus plexippus* (DpN1). Para expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula a ser expresada es fusionada inmediatamente en la dirección del extremo amino libre hacia el extremo carboxi libre del codón de iniciación de polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos son procesadas precisamente en células de insectos y pueden ser usadas para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas celulares Pseudaletia unipuncta (A7S) y Danaus plexipus (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a sistemas celulares de

mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en células de insectos es el uso de células transformadas establemente. Líneas celulares como las células Schneider 2 (S2) y Kc (Drosophila melanogaster) y células C7 (Aedes albopictus) pueden ser usadas para expresión. El promotor netalotioneina de Drosophila puede ser usado para inducir altos niveles de expresión en la presencia de inducción por metales pesados con cadmio o cobre. Vectores de expresión son típicamente mantenidos por el uso de marcadores seleccionables como neomicina e higromicina.

d.Células de Mamíferos

Sistemas de expresión de mamíferos pueden ser usados para expresar proteínas incluyendo polipéptidos de hialuronidasa soluble. Construcciones para expresión pueden ser transferidas a células de mamíferos por infección viral como adenovirus o por transferencia de ADN directa como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos como electroporación y microinyección. Vectores de expresión para células de mamíferos incluyen típicamente un sitio de encapsulación de mARN, un bloque TATA, una secuencia de iniciación translacional (secuencia consensus de Kozac) y elementos de poliadenilación. También pueden añadirse elementos IRES para permitir la expresión bicistrónica con

otro gen, como un marcador seleccionable. Dichos vectores a menudo incluyen mejoradores-promotores transcripcionales para expresión de alto nivel, por ejemplo, el mejorador-promotor de SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV) humano y la repetición terminal prolongada del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos mejoradores-promotores son activos en muchos tipos de células. También pueden ser usados para expresión regiones mejoradoras y promotores de tipo celular y tisular. Regiones mejoradoras/promotoras ejemplares incluyen, pero no se limitan a, aquellas de los genes como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón. Albúmina, alfa fetoproteína, antitripsina alfa 1, beta-globina, proteína básica de mielina, cadena ligera 2 de miosina, y control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica. Pueden usarse marcadores seleccionables para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforibosil transferasa, aminoglicósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Por ejemplo, la expresión puede ser efectuada en la presencia de metotrexate para seleccionar solamente aquellas células que expresan al gen de DHFR. La fusión con moléculas

señalizadoras de superficie celular como TCR-ξ y Fc_t-RI-γ pueden dirigir la expresión de proteínas en un estado activo sobre la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas celulares para expresión de mamíferos, incluyendo células de ratón, rata, humano, mono, pollo y de hámster. Las líneas celulares ejemplares incluyen pero no se limitan a CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretoras) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, células de linfocitos, fibroblastos, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8, y HKB. Las líneas celulares están disponibles adaptadas para medio libre de suero lo cual facilita la purificación de las proteínas secretadas desde el medio de cultivo celular. Ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, # de cat. 11619-012) y la línea celular EBNA-1 libre de suero (Pham y colaboradores, (2003) Biotechnol., Bioeng. 84:32-42). Las líneas celulares también están disponibles que estén adaptadas a crecer en medio especial optimizado para expresión máxima. Por ejemplo, células DG44 CHO están adaptadas para crecer en cultivo en suspensión en un medio químicamente definido, libre de producto animal.

e.Vegetales

Células vegetales transgénicas y plantas pueden ser

usadas para expresar proteínas como cualquiera descrita en la presente. Construcciones de expresión son típicamente transferidas a plantas usando transferencia directa de ADN como bombardeo de microproyectil y transferencia mediada por PEG en protoplastos, y con transformación mediada por *agrobacterium.* Los vectores de expresión pueden incluir secuencias mejoradoras y promotoras, elementos de terminación transcripcional y elementos de control translacional. Vectores de expresión y técnicas de transformación son usualmente divididas entre huéspedes dicotiledóneos, como Arabidopsis y tabaco, y huéspedes monocotiledóneos, como maíz y arroz. Ejemplos de promotores vegetales usados para expresión incluyen el promotor del virus mosaico de colifor, el promotor nopalina sintasa, el promotor bifosfato de ribosa carboxilasa y los promotores ubiquitina y UBQ3. A menudo son usados marcadores seleccionables como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa, para facilitar la selección y mantenimiento de células transformadas. Células vegetales transformadas pueden ser mantenidas en cultivo como células, aglomerados (tejido calloso) o regenerado en plantas enteras. Células vegetales transgénicas también pueden incluir algas diseñadas para producir polipéptidos de hialuronidasa. Porque las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que células de

mamíferos, esto puede influir la selección de la proteína producida en estos huéspedes.

3.Técnicas de Purificación

El método para purificación de polipéptidos, incluyendo polipéptidos de hialuronidasa soluble u otras proteínas, a partir de células huéspedes depender-a de las células huéspedes y de los sistemas de expresión seleccionados. Para moléculas secretadas, las proteínas son purificadas generalmente a partir del medio de cultivo después de remoción de las células. Para expresión intracelular, las células pueden ser lisadas y las proteínas purificadas a partir del extracto. Cuando organismos transgénicos como vegetales y animales transgénicos son usados para expresión, tejidos u órganos pueden ser usados como material inicial para elaborar un extracto celular lisado. Adicionalmente la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos los cuales pueden ser colectados, y si es necesario, las proteínas pueden ser extraídas y purificadas adicionalmente usando métodos estándares en el arte.

Las proteínas, como polipéptidos de hialuronidasa soluble, pueden ser purificadas usando técnicas de purificación de proteínas estándares conocidas en el arte que incluyen pero no se limitan a, SDS-PAGE, cromatografía por

exclusión de tamaño y fracción de tamaño, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía por intercambio iónico, como intercambio aniónico. Las técnicas de purificación por afinidad también pueden ser utilizadas para mejorar la eficiencia y la pureza de las preparaciones. Por ejemplo, anticuerpos, receptores y otras moléculas que enlazan a enzimas hialuronidasas pueden ser usados en purificación por afinidad. Construcciones para expresión también pueden ser diseñados para añadir una marca de afinidad a una proteína como un epítope myc, fusión GST o His_6 y purificada por afinidad con el anticuerpo de myc, la resina glutatión y la resina Ni respectivamente.. La pureza puede ser evaluada por cualquier método conocido en el arte incluyendo técnicas de electroforesis sobre gel y de tinción y espectrofotométricas.

F.Preparación, Formulación y Administración de Inmunoglobulinas y Polipéptidos de Hialuronidasa Soluble

Se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas de inmunoglobulinas y hialuronidasas solubles para administración subcutánea. Las formulaciones de composiciones farmacéuticas de hialuronidasas, por ejemplo, PH20, son conocidas en el arte (véase, por ejemplo, Solicitudes U.S. Nos. US2004/0268425, US2005/0260186 y US2006/0104968). Las hialuronidasas son co-formuladas o co-administradas con formulaciones farmacéuticas de

inmunoglobulina para mejorar la liberación de inmunoglobulinas en sitios deseados en el cuerpo incrementando la biodisponibilidad de inmunoglobulinas. Por ejemplo, la co-administración o co-formulación de IG con una hialuronidasa puede mejorar el grado y/o la velocidad de absorción y por consiguiente la biodisponibilidad de un agente causando que más de él, alcance el torrente sanguíneo y/o menos de él, sea degradado después de administración por permeación más rápida. Lograrse absorción y biodisponibilidad crecientes, por ejemplo, acelerando el flujo intersticial y potencialmente el transporte colectivo después de administración por aplicación de presión hidrostática asociada con inyección del volumen combinada la reducción en la impedancia para flujo asociado con la degradación de hialuronano. Por consiguiente, pueden usarse hialuronidasas solubles para lograr concentraciones elevadas y/o más rápidamente logradas de la inmunoglobulina después de administración subcutánea en comparación con métodos convencionales de administración subcutánea, para proporcionar, por ejemplo, una respuesta más potente y/o más rápida para una dosis dada. Alternativamente, la hialuronidasa soluble puede ser usada para permitir una respuesta dada sea lograda con una dosis más baja de IG administrada. La habilidad de una hialuronidasa soluble para

mejorar el flujo de fluido global en y cerca de un sitio de inyección o infusión también puede mejorar otros aspectos de la liberación farmacológica asociada. Por ejemplo, el incremento el flujo de fluido global puede ayudar a permitir que el volumen de fluido inyectado sea más fácilmente dispersado desde el sitio de inyección (reduciendo dolor potencial u otras consecuencias adversas de la inyección). Esto es particularmente importante para infusiones subcutáneas para permitir que dosis más altas sean administradas. Además de la biodisponibilidad creciente, la co-administración o co-formulación de IG con hialuronidasa soluble proporciona una ruta de administración más conveniente o más segura en comparación con las rutas de administración intravenosas convencionales.

Por consiguiente, en virtud de la biodisponibilidad creciente, las inmunoglobulinas pueden ser administradas subcutáneamente a dosificaciones y frecuencias para las cuales las preparaciones intravenosas (IVIG) corrientes son preparadas y administradas. Las ventajas sobre las formulaciones subcutáneas corrientes de IG es que Hialuronidasa/IG co-administrada o co-formulada puede dar como resultado regímenes de dosificación más favorables, por ejemplo, dosificación menos frecuente, Por menos frecuente o dosificación más baja, los efectos secundarios asociados con

la toxicidad pueden ser reducidos. Generalmente, la farmacocinética y/o farmacodinámica de la terapia con IG subcutánea es mejorada. Además, administraciones subcutáneas de IG también tienen ventajas sobre las infusiones intravenosas corrientes. Por ejemplo, la infusión subcutánea permite la infusión por el paciente o la familia opuestamente a una enfermera experta, la infusión puede lograrse a velocidades más altas de modo que la IG sea infusionada en 1-3 horas en vez de 5 - 10 horas para terapias IVIG convencionales; no hay requerimiento para venas funcionales; no hay efectos secundarios relacionados con la infusión, como trombosis, jaqueca, tromboflebitis, y náuseas y menos probabilidad de eventos adversos; y la infusión puede efectuarse en casa o en cualquier parte.

Las composiciones pueden ser formuladas en forma líquida o, liofilizada. Cuando las composiciones son proporcionadas en forma liofilizada pueden ser reconstituidas justamente antes de uso por medio de un regulador apropiado, por ejemplo, una solución salina estéril. Las composiciones pueden ser proporcionadas juntas o separadamente. Para propósitos de la presente, dichas composiciones típicamente se proporcionan separadamente. La hialuronidasa soluble y la IG pueden ser empacadas como composiciones separadas para administración juntas, secuencial o intermitentemente. Las

composiciones pueden ser empacadas como un equipo.

1.Formulaciones

Los compuestos pueden ser formulados en cualquiera de las preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración subcutánea como soluciones, suspensiones, polvos, o formulaciones de liberación sostenida. Típicamente, los compuestos son formulados en composiciones farmacéuticas que usan técnicas y procedimientos bien conocidos en el arte (véase por ejemplo, Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta Edición, 1985, 126). Las composiciones farmacéuticas aceptables son preparadas en vista de aprobaciones para una agencia reguladora u otra agencia preparada de conformidad con la Farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y en humanos. La formulación deberá adaptarse al modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores como diluyentes, adyuvantes, excipientes, o vehículos con los cuales la hialuronidasa o la IG es administrada. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad efectiva terapéuticamente del compuesto, generalmente en forma purificada o en forma parcialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de portador de modo de proporcionar

la forma para administración apropiada al paciente. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo aquellos de orígen animal, vegetal, de petróleo o sintético, como aceite de cacahuate, aceite de semilla de soya, aceite mineral, y aceite de sésamo. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica es administrada intravenosamente. También pueden emplearse soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol, como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un ingrediente activo: un diluyente como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, o carboximetil celulosa; un lubricante, como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante como almidón, gomas naturales, como goma arábiga, gelatina, glucosa, molasas, polivinil pirrolidina, celulosas y derivados de éstas, povidona, crospovidonas y otras aglutinantes diferentes conocidos por el experto en el arte. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, carbonato cálcico, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes

humectantes o emulsificantes, o agentes reguladores del pH, por ejemplo acetato de sodio, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaureato de sorbitan, trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros de dichos agentes.

Los compuestos activos terapéutica y farmacéuticamente y derivados de éstos son formulados típicamente y administrados en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Cada dosis unitaria contiene una cantidad pre-determinada de compuesto activo terapéuticamente suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Ejemplos de formas de dosis unitaria incluyen ampolletas y jeringas y tabletas o cápsulas empacadas individualmente. Las formas de dosis unitaria pueden ser administradas en fracciones o múltiples de éstas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitaria idénticas empacadas en un contenedor individual para ser administrada en forma de dosis unitaria segregada. Ejemplos de formas de dosis múltiple incluyen frasquitos, botellas de tabletas o cápsulas o botellas de pintas o galones. Por lo tanto, forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitaria que no son segregadas al empacar. Generalmente, pueden prepararse formas de dosificación o composiciones que contienen ingrediente

activo en el intervalo de 0.005 % a 100 % con el equilibrio hecho de portador no tóxico.

Las composiciones proporcionadas en la presente típicamente son formuladas para administración por la ruta subcutánea, aunque se contemplan otras rutas de administración, como cualquier ruta conocida por el experto en el arte incluyendo inyección intramuscular, intravenosa, intradérmica, intralesiones, inyección intraperitoneal, administración epidural, nasal, oral, vaginal, rectal, tópica, local, ótica, inhalacional, bucal (por ejemplo, sub-lingual) y transdérmica o cualquier ruta. Formulaciones adecuadas para dichas rutas son conocidas por un experto en el arte. La administración puede ser local, tópica o generalizada dependiendo del locus del tratamiento. La administración local a un área en necesidad de tratamiento puede lograse, por ejemplo, pero no limitándose a, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo conjuntamente con un apósito de herida después de cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante. Las composiciones pueden ser administradas con otros agentes activos biológicamente, ya sea secuencial o intermitentemente o en la misma composición. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada incluyendo formulaciones de

liberación controlada y dispositivos de liberación controlada, como por medio de una bomba.

La ruta más adecuada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores, como la naturaleza de la enfermedad, el progreso de la enfermedad, la severidad de la enfermedad, la composición particular que es usada. Para propósitos de la presente, se desea que la hialuronidasa sea administrada de modo que alcance el intersticio de piel o tejidos, degradando así el espacio intersticial, por liberación subsecuente de inmunoglobulina. Por consiguiente, se contempló la administración directa bajo la piel, como por métodos de administración subcutánea. Así, en un ejemplo, la administración local puede lograrse por inyección, como desde una jeringa u otro artículo de fabricación que contenga un dispositivo de inyección como una aguja. En otro ejemplo, la administración local puede lograrse por infusión, la cual puede ser facilitada por medio del uso de una bomba u otro dispositivo similar. También se contemplan otros modos de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas en formas de dosificación apropiadas para cada ruta de administración.

Se contempla en la presente la administración subcutánea, generalmente caracterizada por inyección o infusión. Los inyectables pueden ser preparados en formas

convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de inyección, o como emulsiones. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las composiciones farmacéuticas pueden contener otras cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas como agentes humectantes o emulsificantes, agentes reguladores de pH, estabilizantes, mejoradores de solubilidad, y otros de dichos agentes, como por ejemplo, acetato de sodio, monolaureato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. Se contempla también en la presente la implantación de un sistema de liberación sostenida o lenta, de modo que un nivel constante de dosificación sea mantenido (véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 3,710,795). El porcentaje de compuesto activo contenido en dichas composiciones es muy dependiente de la naturaleza específica de éste, así como también de la actividad del compuesto y de las necesidades del sujeto.

Los inyectables son diseñados para administración local y generalizada. Para propósitos de la presente, la administración local es deseada para administración directa al intersticio afectado. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles secos estériles,

como polvos liofilizados, listos para ser combinados con un solvente justamente antes de uso, que incluyen tabletas hipodérmicas, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para ser combinados con un vehículo justamente antes de uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser ya sea acuosas o bien no acuosas. Si se administran intravenosamente, portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina regulada con fosfato (PBS), y soluciones que contengan agentes espesantes y solubilizantes, como glucosa, polietilenglicol, y propilenglicol y mezclas de éstos.

Los portadores aceptables farmacéuticamente usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, reguladores, antioxidantes, anestésicos locales, agentes dispersantes y para suspensión, agentes emulsificantes, agentes secuestrantes o quelante y otras sustancias aceptables farmacéuticamente. Ejemplos de vehículos acuosos incluyen Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa Isotónica, Inyección de Agua Estéril, Inyección de Ringer Lacteada y Dextrosa. Vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de orígen vegetal, aceite de semilla de algodón,

aceite de maíz, aceite de sésamo, y aceite de cacahuate. Pueden añadirse gentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales empacadas en contenedores de dosis múltiple, los cuales incluyen, los cuales incluyen fenoles o cresoles, mercurianos, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres metílico y propílico del ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Reguladores incluyen fosfato y citrato. Antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Agentes de suspensión y dispersantes incluyen carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropil metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Agentes emulsificantes incluyen Polisorbato 80 (TEENs 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste de pH.

La concentración del compuesto activo farmacéuticamente es ajustada de modo que una inyección proporcione una cantidad efectiva para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad,

peso y condición del paciente o animal como es sabido en el arte. Las preparaciones parenterales en dosis unitaria son empacadas en una ampolleta, un frasquito o una jeringa con aguja. El volumen de solución líquida o preparación de polvo reconstituído, que contenga el compuesto activo farmacéuticamente, es una función de la enfermedad a ser tratada y del artículo de fabricación particular seleccionado para empaque. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles; como es sabido y practicado en el arte.

En un ejemplo, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones. Si se proporciona en forma líquida, las preparaciones farmacéuticas pueden ser proporcionadas como una preparación concentrada para ser diluida a una concentración efectiva terapéuticamente antes de uso. Dichas preparaciones líquidas pueden ser preparadas por medios convencionales con aditivos aceptables farmacéuticamente como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsificantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, o aceites vegetales fraccionados); y conservadores (por ejemplo, metil o propil

p-benzoatos o ácido sórbico). En otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden ser presentadas en forma liofilizada para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso.

Pueden emplearse métodos de administración para disminuir la exposición de compuestos seleccionados a procesos degenerativos, como degradación proteolítica e intervención inmunológica vía antigénica y respuestas inmunogénicas. Ejemplos de dichos métodos incluyen administración local en el sitio de tratamiento. La PEGilación de productos terapéuticos se ha reportado que incrementa la resistencia a la proteolisis, incrementa la vida media plasmática y disminuye la antigenicidad y la inmunogenicidad. Ejemplos de metodologías de PEGilación son conocidos en el arte (véase por ejemplo, Lu y Félix, Int. J. Peptide Protein Res., 43: 127-138, 1994; Lu y Félix, Peptide Res., 6: 142-6, 1993; Félix y colaboradores, Int. J. Peptide Res., 46: 253-64, 1995; Benhar y colaboradores, J. Biol. Chem., 269:13398-404, 1994; Brumeanu y colaboradores, J. Immunol., 154: 3088-95, 1995; véase también Caliceti y colaboradores (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10):1261-77 y Molineux (2003) Pharmacotherapy 23(8 Pt 2): 3S-8S). La PEGilación también puede ser usada en la liberación de moléculas de ácido nucleico in vivo. Por ejemplo, la

PEGilación de adenovirus puede incrementar la estabilidad y la transferencia genética (véase, por ejemplo, Cheng y colaboradores (2003) Pharm. Res. 20(9): 1444-51).

Polvos Liofilizados

Son de interés en la presente los polvos liofilizados, los cuales pueden ser reconstituidos para administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. Pueden también ser reconstituidos y formulados como sólidos o geles.

El polvo liofilizado, estéril, es preparado disolviendo un compuesto activo en una solución reguladora. La solución reguladora puede contener un excipiente, el cual mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituída, preparada a partir del polvo. La filtración estéril subsecuente de la solución seguida por liofilización bajo condiciones estándares conocidas por los expertos en el arte proporciona la formulación deseada. Resumiendo, el polvo liofilizado es preparado disolviendo un excipiente, como dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, en un regulador adecuado, como citrato de sodio o fosfato de potasio u otro regulador diferente conocido por los expertos en el arte. Luego, se añade una enzima seleccionada a la mezcla resultante, y se agita hasta que

disuelva. La mezcla resultante es filtrada en medio estéril o tratada para remover partículas y asegurar la esterilidad, y se distribuye en frasquitos para liofilización. Cada frasquito contiene una dosificación individual o dosificaciones múltiples del compuesto. El polvo liofilizado puede ser almacenado bajo condiciones apropiadas, como a aproximadamente 4 °C a temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con una solución reguladora proporciona una formulación para uso en administración parenteral.

2.Dosificación y Administración

La hialuronidasa soluble proporcionada en la presente puede ser formulada como composiciones farmacéuticas, típicamente para administración en dosificación individual, en combinación con la IG. La hialuronidasa soluble seleccionada es incluida en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil de la IG en la ausencia de efectos secundarios indeseables sobre el paciente tratado. La concentración terapéuticamente efectiva puede ser determinada empíricamente probando los polipéptidos en sistemas in vitro e in vivo conocidos como por medio del uso de ensayos proporcionados en la presente o conocidos en el arte (véase por ejemplo, Taliani y colaboradores (1996) Anal. Biochem., 240: 60-67;

Filocamo y colaboradores (1997) J. Virology, 71:1417-1427; Sudo y colaboradores (1996) Antiviral Res. 32: 9-18; Buffard y colaboradores (1995) Virology, 209: 52-59; Bianchi y colaboradores (1996) Anal. Biochem., 237: 239-244; Hamatake y colaboradores (1996) Intervirology 39: 249-258; Steinkuhler y colaboradores (1998) Biochem., 37:8899-8905; D'Souza y colaboradores (1995) J. Gen. Virol., 76: 1729-1736; Takeshita y colaboradores (1997) Anal. Biochem., 247: 242-246; véase también por ejemplo Shimizu y colaboradores (1994) J. Virol. 68:8406-8408; Mizutani y colaboradores (1996) J. Virol. 70: 7219-7223; Mizutani y colaboradores (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 227: 822-826; Lu y colaboradores (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 93:1412-1417; Hahm y colaboradores, (1996) Virology, 226: 318_326; Ito y colaboradores (1996) J. Gen. Virol., 77: 1043-1054; Mizutani y colaboradores (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun, 212: 906-911; Cho y colaboradores (1997) J. Virol. Meth. 65:201-207 y luego extrapolados a partir de éstos para dosificación a humanos.

Típicamente, una dosis efectiva terapéuticamente es a o aproximadamente 500 Unidades a 100,000 Unidades de una hialuronidasa soluble. Por ejemplo, hialuronidasa soluble puede ser administrada subcutáneamente a o aproximadamente 500 unidades, 1,000 Unidades, 2,000 Unidades, 5,000 Unidades, 10,000 Unidades, 30,000 Unidades, 40,000 Unidades, 50,000

Unidades, 60,000 Unidades, 70,000 Unidades, 80,000 Unidades, 90,000 Unidades, 100,000 Unidades o más. En algunos ejemplos, pueden proporcionarse dosificaciones como una proporción de la IG administrada. Por ejemplo, la hialuronidasa puede ser administrada a 10 U/g a 500 U/g o más de IG, por ejemplo a o aproximadamente 10 U/g, 20 U/g, 30 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 200 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g o más. Típicamente, volúmenes de inyecciones o infusiones de hialuronidasa contemplados en la presente son desde o aproximadamente 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL o más. La hialuronidasa puede ser proporcionada como una solución madre a o aproximadamente 50 U/mL, 100 U(mL, 150 U/mL, 200 U/mL, 400 U/mL o 500 U/mL o puede ser proporcionada en una forma más concentrada, por ejemplo a o aproximadamente 1,000 U/mL, 1,500 U/mL, 2,000 U/mL, 4,000 U/mL o 5,000 U/mL para uso directamente o para dilución a la concentración efectiva antes de uso. La hialuronidasa soluble puede ser proporcionada como una formulación líquida o liofilizada. Formulaciones liofilizadas son ideales para almacenamiento de grandes dosis de Unidades de hialuronidasa soluble.

Las preparaciones de inmunoglobulina proporcionadas en la presente pueden ser formuladas como composiciones

farmacéuticas para uso en dosificación individual o múltiple. Generalmente, las preparaciones de IG son formuladas en composición farmacéuticas para lograr regímenes de dosificación (dosis y frecuencias) para las cuales son preparadas las preparaciones intravenosas (IVIG) corrientes y administradas para enfermedades o condiciones tratables por IG particulares. Un experto en el arte está familiarizado con regímenes de dosificación para administración IVIG de enfermedades o condiciones particulares. Por ejemplo, la sección H posterior proporciona regímenes de dosificación ejemplares (dosis y frecuencias) de IG para enfermedades y condiciones particulares. Otros regímenes de dosificación son bien conocidos por los expertos en el arte. En algunos ejemplos, la frecuencia de dosificación puede ser diaria durante un intervalo de tiempo dado durante días consecutivos o alternados, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días. En otros ejemplos, el régimen de dosificación es semanalmente, por ejemplo, una vez cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas o más. Típicamente, preparaciones de inmunoglobulina son formuladas para administración en dosis individual en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis de una vez mensualmente, pero puede ser proporcionada en cantidades menores para administraciones en

dosificación múltiple. Por ejemplo, dosis de una vez mensualmente de preparaciones de IG pueden ser administradas diariamente, semanalmente, bisemanalmente o una vez al mes. Regímenes de dosificación pueden ser continuos por meses o años. Las preparaciones de IG pueden ser proporcionadas en forma líquida o liofilizada como se discutió en otra parte de la presente.

La inmunoglobulina es proporcionada en una dosis efectiva terapéuticamente. La concentración efectiva terapéuticamente puede ser determinada empíricamente probando los compuestos en sistemas in vitro e in vivo conocidos, como los ensayos proporcionados en la presente. La concentración de una inmunoglobulina seleccionada en la composición depende de la absorción, inactivación y velocidades de excreción del complejo, las características fisicoquímicas del complejo, el programa de dosificación, y cantidad administrada así como también otros factores conocidos por el experto en el arte. Por ejemplo, se comprende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función del tejido que es tratado y puede ser determinada empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación a partir de datos de prueba in vivo o in vitro. Se hace notar que los valores de las concentraciones y de la dosificación pueden también variar con la edad del individuo tratado.

Adicionalmente, se comprende que para cualquier sujeto particular, regímenes de dosificación específicos deberán ser ajustados con el tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o que supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración expuestos en la presente son solamente ejemplares y no están previstos para limitar el alcance de ésta. La cantidad de una preparación de inmunoglobulina seleccionada a ser administrada para el tratamiento de una enfermedad o condición, por ejemplo una enfermedad o condición tratable con IG, puede ser determinada por medio de técnicas clínicas estándares. Además, ensayos in vitro y modelos animales pueden ser empleados para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos.

Por consiguiente, la dosificación precisa, la cual puede ser determinada empíricamente, puede depender de la preparación de inmunoglobulina particular, el régimen y el programa de dosificación con la hialuronidasa soluble, la ruta de administración, el tipo de enfermedad a ser tratada y la seriedad de la enfermedad. Generalmente, las preparaciones de IG tienen una concentración de proteína que es o es de aproximadamente 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de composición de

IG, como, por ejemplo, 10 % en peso/volumen. Por ejemplo, IG es proporcionada en una cantidad que permita la administración subcutánea de una dosis equivalente a una dosis IV de una vez mensualmente para la indicación particular que es tratada. La dosis IV una vez mensualmente particular es una función de la enfermedad a ser tratada, y así puede variar. Intervalos de dosificación ejemplares para administración subcutánea de IG son desde a o aproximadamente 1 gramo (g), 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g, o 200 g. La dosificación particular y las formulaciones de ésta dependen de la indicación y del individuo. Por ejemplo, pueden administrarse dosificaciones a 50 mg/kg de peso corporal (PC), 100 mg/kg de PC, 200 mg/kg de PC, 300 mg/kg de PC, 400 mg/kg de PC, 500 mg/kg de PC, 600 mg/kg de PC, o más. Si es necesario la dosificación puede determinarse empíricamente. Para lograr dichas dosificaciones, volúmenes de preparaciones de IG administrados subcutáneamente pueden ser a o aproximadamente 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL o más. Por ejemplo, una formulación líquida de IG al 10 % (100 mg/mL) para indicaciones descritas en la presente, puede ser administrada en un volumen de 50 mL a 700 mL para lograr una dosificación de 0.5 g a 70 g de IG.

Cuando son administrados grandes volúmenes, la

administración es típicamente por infusión. Los sujetos pueden ser dosificados a velocidades de infusión a o aproximadamente 0.5 mL/kg de PC/h, 1 mL/kg de PC/h, 2 mL/kg de PC/h, 3 mL/kg de PC/h, 4 mL/kg de PC/h, o 5 mL/kg de PC/h. La velocidad de infusión puede ser determinada empíricamente, y típicamente es una función de la tolerancia del sujeto. Si tiene lugar una reacción adversa durante la infusión, la velocidad de infusión puede bajarse a la velocidad inmediatamente inferior a la cual tuvo lugar el evento adverso. Si el evento adverso se resuelve en respuesta a la reducción en la velocidad, la velocidad de infusión puede ser incrementada lentamente a discreción del médico. Las infusiones de IG subcutáneas pueden ser facilitadas por la gravedad, infusión por bombeo o inyección de una dosis total de 20 a 30 gramos. Generalmente, para infusión intravenosa, pueden emplearse las bombas de infusión. IG puede ser infusionada a velocidades a o de aproximadamente 5 mL/h, 10 mL/h, 30 mL/h, 60 mL/h, 120 mL/h, 240 mL/h o 300 mL/h. Las velocidades de infusión pueden ser incrementadas durante el transcurso del tratamiento siempre que la infusión sea tolerada por el paciente. Generalmente, el tiempo de administración de la infusión es a o de aproximadamente 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h, 4 h o más. Debido a la alta velocidad de infusión lograda por administración subcutánea

de IG coformulada y/o coadministrada con hialuronidasa, el tiempo de infusión es significativamente menos que para las terapias IVIG convencionales. Cuando el tiempo de infusión excede el límite deseado, puede iniciarse un segundo sitio de infusión a discreción del sujeto y del médico. El segundo sitio típicamente es iniciado al menos 10 cm del sitio inicial.

Las técnicas para infusión son conocidas por un experto en el arte, y está en la experiencia de un médico tratante. Generalmente, la dosis apropiada de IG puede ser conjuntada en una bolsa de IV estándar. Por ejemplo, puede usarse un equipo para infusión sin venteo que tenga un puerto en "Y" cerca de su terminus. Puede insertarse una aguja para infusión subcutánea calibre 24 en un sitio de la preferencia del sujeto, pero el abdomen y en segundo término los muslos son recomendados por el volumen de solución a ser infusionado. La hialuronidasa y la IG pueden ser proporcionadas en el mismo equipo de puerto en "Y". También pueden usarse en la presente otros artículos de fabricación para propósitos de infusión por gravedad o una bomba, e incluyen pero no se limitan a tubos, botellas, jeringas u otros contenedores.

La hialuronidasa soluble puede ser administrada subsecuente, intermitente o simultáneamente de la preparación

de IG. Generalmente, la hialuronidasa es administrada antes de la administración de la preparación de IG para permitir a la hialuronidasa degradar el ácido hialurónico en el espacio intersticial. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede ser administrada 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 20 minutos, o 30 minutos antes de la administración de la preparación de IG. En algunos ejemplos, la hialuronidasa es administrad ajunto con la preparación de inmunoglobulina. Como apreciarán los expertos en el arte, al proximidad deseada de co-administración depende en parte significativa de la vida media efectiva de los agentes en el tejido particular involucrado, y de la enfermedad particular que es tratada, y puede ser optimizada fácilmente probando los efectos de administrar los agentes a tiempos variables en modelos adecuados, como en modelos animales adecuados. En algunas situaciones, el tiempo óptimo de administración de la hialuronidasa excederá de 60 minutos.

Generalmente, antes de infusión de IG, es inyectada una hialuronidasa soluble a una velocidad de o de aproximadamente 0.2 mL/min, 0.5 mL/min, 1 mL/min, 2 mL/min, 5 mL/min, 10 mL/min o más. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede ser inyectada a través del mismo puerto en "Y" usado para infusión subsecuente de IG. Como se indicó

anteriormente, el volumen de hialuronidasa soluble administrada es una función de la dosificación requerida, pero puede variar dependiendo de la concentración de una formulación madre de hialuronidasa soluble disponible. Por ejemplo, se contempló en la presente que la hialuronidasa soluble no sea administrada en volúmenes mayores que aproximadamente 50 mL, y típicamente es administrada en un volumen de 5 - 30 mL. Puede usarse una bomba de jeringa para los volúmenes mayores, a discreción del médico.

En el caso en el que una infusión no sea tolerada (por ejemplo, cause reacciones locales moderadas a severas), puede iniciarse un segundo sitio de infusión de modo que el sujeto reciba la dosificación total.

Una preparación de IG puede ser administrada en una vez, o puede ser dividida en un número de dosis más pequeñas a ser administradas a intervalos de tiempo. Las preparaciones de Ig seleccionadas pueden ser administradas en una o más dosis durante el transcurso de un tiempo de tratamiento, por ejemplo, durante varias horas, días, semanas, o meses. En algunos casos, es útil la administración continua. Se entiende que la dosificación precisa y el curso de administración depende de la indicación y tolerancia del paciente.

También, se comprende que la dosificación precisa y

la duración del tratamiento es una función de la enfermedad que es tratada y pueden ser determinados empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación de datos de pruebas in vivo e in vitro. Se hace notar que los valores de concentraciones y dosificaciones también pueden variar con la severidad de la condición a ser aliviada. Adicionalmente, se comprende que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberán ser ajustados con el tiempo de conformidad con la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o que supervisa la administración de las composiciones, y que las variaciones de concentración expuestas en la presente son ejemplares solamente y no están previstas para limitar el alcance o uso de composiciones y combinaciones que las contienen. Las composiciones pueden ser administradas horaria, diaria, semanal, mensualmente o una vez. Generalmente, regímenes de dosificación son seleccionados para limitar la toxicidad. Se debe hacer notar que el médico que atiende deberá saber cómo y cuando terminar, interrumpir o ajustar la terapia a dosificación más baja debido a la toxicidad, o disfunciones de la médula ósea, de hígado o de riñón o de otro tejido. Contrariamente, el médico que atiende también debe saber cómo y cuando ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada

(previniendo efectos tóxicos secundarios).

G.Métodos de Evaluar la Actividad, Biodisponibilidad y Farmacocinética

Pueden usarse ensayos para evaluar las actividades in vivo e in vitro de inmunoglobulina sola o en combinación con una hialuronidasa soluble. Entre dichos ensayos se incluyen aquellos que evalúan las propiedades farmacocinéticas de inmunoglobulina administrada subcutáneamente, que incluyen la biodisponibilidad y la tolerancia. La actividad biológica de ambas, inmunoglobulina y hialuronidasa soluble también puede ser evaluada usando ensayos bien conocidos en el arte. Dichos ensayos pueden ser usados, por ejemplo, para determinar dosificaciones apropiadas de inmunoglobulina y hialuronidasa, y la frecuencia de dosificación, para tratamiento.

1.Farmacocinética y Tolerancia

Los estudios farmacocinéticos y de tolerancia , como los descritos en el Ejemplo 1 posterior, pueden ser efectuados usando modelos animales o pueden ser efectuados durante estudios clínicos con pacientes. Los modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, cobayos y modelos primates no humanos, como los monos cinomolgus o los macacos rhesus. En algunos casos, los estudios farmacocinéticos y de tolerancia son efectuados

usando animales saludables. En otros ejemplos, los estudios son efectuados usando modelos animales de una enfermedad para la cual es considerada la terapia con inmunoglobulina, como modelos animales de cualquiera de las enfermedades y condiciones descritas posteriormente.

La farmacocinética de la inmunoglobulina administrada subcutáneamente puede ser evaluada midiendo dichos parámetros como la concentración plasmática máxima (pico) de inmunoglobulina (C_{max}), el tiempo pico, (es decir, cuando tiene lugar la concentración plasmática máxima de inmunoglobulina (T_{max})), la concentración plasmática mínima de inmunoglobulina (es decir la concentración plasmática mínima entre dosis de inmunoglobulina; C_{min}), la vida media de eliminación (T1/2) y el área bajo la curva (es decir, el área bajo la curva generada por graficación del tiempo contra la concentración plasmática de inmunoglobulina; AUC), después de administración. La biodisponibilidad absoluta de inmunoglobulina administrada subcutáneamente es determinada comparando el área bajo la curva de inmunoglobulina después de liberación subcutánea (AUC_{sc}) con el AUC de inmunoglobulina después de liberación intravenosa (AUC_{iv}). La biodisponibilidad absoluta (F), puede ser calculada usando la fórmula $F = ([AUC]_{sc} \times dosis_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times dosis_{iv})$. La concentración de inmunoglobulina en el plasma después de

administración subcutánea puede ser medida usando cualquier método conocido en el arte adecuado para evaluar concentraciones de inmunoglobulina en muestras de sangre. Métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ELISA y nefelometría.

Un intervalo de dosis y diferente frecuencia de dosificación de dosificaciones pueden ser administradas en los estudios farmacocinéticos para evaluar el efecto de disminuir o aumentar las concentraciones de inmunoglobulina y/o de hialuronidasa en la dosis. Las propiedades farmacocinéticas de inmunoglobulina administrada subcutáneamente, como biodisponibilidad, también pueden ser evaluadas con o sin co-administración de hialuronidasa. Por ejemplo, a perros como sabuesos, se les puede administrar inmunoglobulina subcutáneamente en combinación con hialuronidasa, o sola. También se dieron dosis intravenosas de inmunoglobulina a otro grupo de sabuesos. Pueden entonces tomarse muestras de sangre a varios tiempos puntuales y determinar la cantidad de inmunoglobulina en el plasma, como por nefelometría. Puede entonces medirse el AUC y puede determinarse la biodisponibilidad de inmunoglobulina administrada subcutáneamente, administrada con o sin hialuronidasa. Dichos estudios pueden ser efectuados para evaluar el efecto de la co-administración con hialuronidasa

sobre las propiedades farmacocinéticas, como la biodisponibilidad, de inmunoglobulina administrada subcutáneamente.

Los estudios para evaluar la seguridad y la tolerancia también son conocidos en el arte y pueden ser usados en la presente. Después de administración subcutánea de inmunoglobulina con o sin co-administración de hialuronidasa, puede monitorearse el desarrollo de cualquiera de las reacciones adversas. Las reacciones adversas pueden incluir, pero no limitarse a, reacciones en el sitio de inyección, como edema o hinchazón, jaqueca, fiebre, fatiga, escalofríos, bochornos, vértigo, urticaria, respiración ruidosa u opresión torácica náuseas, vómitos, rigor, dolor de espalda, dolor de pecho, calambres musculares, accesos o convulsiones, cambios en la presión sanguínea y respuestas anafilácticas o de hipersensibilidad severa. Típicamente, un intervalo de dosis y diferentes frecuencias de dosificación son administradas en los estudios de seguridad y tolerancia para evaluar el efecto de aumentar o disminuir las concentraciones de inmunoglobulina y/o de hialuronidasa en la dosis.

2.Actividad Biológica

a.Inmunoglobulina

La habilidad de inmunoglobulina para actuar como un

agente terapéutico puede ser evaluada in vitro o in vivo. Por ejemplo, pueden efectuarse ensayos in vivo para evaluar la habilidad de inmunoglobulina para neutralizar la infectividad viral o bacteriana (Hiemstra y colaboradores, (1994) J Lab Clin Med 123:241-6). Otros ensayos in vitro pueden ser utilizados para evaluar otras actividades biológicas de inmunoglobulina. Por ejemplo, la habilidad de preparaciones de inmunoglobulina para interactuar con y modular productos de activación de complemento, enlazar anticuerpos idiotípicos, enlazar a receptores de Fc sobre macrófagos, y suprimir varios mediadores inflamatorios incluyendo citoquinas, quimioquinas, y metaloproteinasas, pueden ser expresados usando cualquier método conocido en el arte, incluyendo, pero no limitándose a ELISA, tinción Western, tinción Northern y citometría de flujo para evaluar la expresión del marcador. Por ejemplo, el efecto de inmunoglobulina sobre la expresión de receptores de quimioquina sobre células mononucleares de sangre periférica puede ser evaluada usando citometría de flujo (Trebs y colaboradores (2006) Eur J Neurology). En otro ejemplo, el efecto de inmunoglobulina sobre la expresión de metaloproteínasa en macrófagos puede ser evaluada usando análisis por tinción Northern (Shapiro y colaboradores (2002) Cancer 95:2032-2037).

También pueden ser efectuados estudios in vivo usando modelos animales para evaluar la actividad terapéutica de inmunoglobulina. La inmunoglobulina puede ser administrada a modelos animales infectados con uno o más microorganismos y pueden evaluarse el efecto sobre el progreso de la infección, como midiendo el número de microorganismos o midiendo el peso como un marcador de morbilidad. El efecto terapéutico de inmunoglobulina también puede ser evaluado usando modelos animales de las enfermedades y condiciones para las cuales se considera la terapia usando inmunoglobulina. Dichos modelos animales son conocidos en el arte, e incluyen, pero no se limitan a, modelos de animales pequeños para agamaglobulinemia congénita o ligada al cromosoma X (XLA), SCID, síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Guillain-Barré, ITP, poliomiositis, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, Miastenia gravis y síndrome de Moersch-Woltmann (Czitrom y colaboradores (1985) J immunol 134:2276-2280, Ellmeier y colaboradores, (2000) J Exp Med 192:1611-1624, Ohno (2006) Drug Discovery Today: Disease Models 3:83-89, Oyaizy y colaboradores (1988) J Exp Med 2017-2022, Hansen y colaboradores, (2002) Blood 100:2087-2093, Strongwater y colaboradores, (1984) Arthritis Rheum. 27:433-42, Kim y colaboradores (1998) Annals NY Acad Sci 841:670-676, Christadoss y colaboradores (2000) 94:7-87, Sommer y

colaboradores, (2005) Lancet 365:1406-1411, Patente U.S. No. 7309810).

b.Hialuronidasa

La actividad hialuronidasa puede ser evaluada usando métodos bien conocidos en el arte. En un ejemplo, la actividad es medida usando un ensayo de microturbidez. Este, está basado en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se enlaza con albúmina de suero. La actividad es medida por incubación de hialuronidasa con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) Por un período de tiempo (por ejemplo 10 minutos) y luego precipitando el hialuronato de sodio sin digerir con la adición de albúmina de suero acidificada. La turbidez de la muestra resultante es medida a 640 nm después de un período de desarrollo adicional. La disminución en turbidez que resulta de la actividad hialuronidasa sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad enzimática de la hialuronidasa. En otro ejemplo, la actividad hialuronidasa es medida usando un ensayo de microtítulo en el cual el ácido hialurónico biotinilado residual es medido después de incubación con hialuronidasa (véase por ejemplo, Frost y Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, Publicación de Patente U.S. No 2005/0260186). Los grupos carboxilo libres sobre los residuos de ácido glucurónico de ácido hialurónico

son biotinilados, y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado es acoplado covalentemente a una placa de microtítulo. Después de incubación con hialuronidasa, el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual es detectado usando una reacción de avidina-peroxidasa, y es comparado con el obtenido después de reacción con estándares de hialuronidasa de actividad conocida. También son conocidos en el arte otros ensayos para medir la actividad hialuronidasa y pueden ser usados en los métodos de la presente (véase por ejemplo Delpech y colaboradores, (1995) Anal. Biochem. 229:35-41; Takahashi y colaboradores, (2003) Anal. Biochem. 322:257-263).

La habilidad de hialuronidasa para actuar como un agente diseminador o difusor también puede ser evaluada. Por ejemplo, el colorante azul de triptano puede ser inyectado subcutáneamente con o sin hialuronidasa en la piel lateral sobre cada lado de ratón desnudo. El área colorada es entonces medida, como con un calibre micrométrico, para determinar la habilidad de hialuronidasa para actuar como un agente diseminador (Patente U.S. No. 206/0104968).

H. Usos Terapéuticos

Los métodos descritos en la presente pueden ser usados para tratamiento de cualquier condición para la cual sea empleada inmunoglobulina. La inmunoglobulina (IG) puede

ser administrada subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa, para tratar cualquier condición que sea corregible con tratamiento con inmunoglobulina. Esta sección proporciona usos terapéuticos ejemplares de IG. Los usos terapéuticos descritos posteriormente son ejemplares y no limitan las aplicaciones de los métodos descritos en la presente. Los usos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, terapia de reemplazo de inmunoglobulina y terapia de inmunomodulación para varias condiciones y enfermedades inmunológicas, hematológicas, neurológicas, inflamatorias, dermatológicas y/o infecciosas. En algunos ejemplos, la inmunoglobulina es administrada para aumentar la respuesta inmune en pacientes saludables, como después de posible exposición a enfermedades infecciosas (por ejemplo, daño por pinchazo accidental con aguja). Está en la experiencia de un médico tratante identificar dichas enfermedades o condiciones.

La inmunoglobulina puede ser co-administrada subcutáneamente con hialuronidasa, en combinación con otros agentes usados en el tratamiento de estas enfermedades y condiciones. Por ejemplo, otros agentes que pueden ser administrados incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, quimioterapéuticos, anti-inflamatorios esteroidales, anti-inflamatorios no esteroidales, y otros agentes

inmunomoduladores como citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento.

Si es necesario, puede ser determinado empíricamente o extrapolado un protocolo de dosificación particular y duración de tratamiento. Por ejemplo, dosis ejemplares de inmunoglobulina administrada intravenosamente pueden ser usadas como un punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas. Los niveles de dosificación pueden ser determinados con base en una variedad de factores, como peso corporal del individuo, salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la severidad y el curso de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el juicio del médico tratante. Generalmente, las dosificaciones de inmunoglobulina son desde o aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal (es decir, 100 mg/kg de PC) a 2 g/kg de PC, y las dosificaciones de hialuronidasa son desde o aproximadamente 100 U/gramo a 500 U/g o más de inmunoglobulina, por ejemplo, a o aproximadamente 10 U/g, 20 U/g, 30 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 200 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g o más. Se comprende que la cantidad a administrar será una función de la indicación tratada, y posiblemente los efectos secundarios serán tolerados. Las

dosificaciones pueden ser determinada empíricamente usando modelos reconocidos para cada trastorno.

Después de mejoramiento de una condición de un paciente, una dosis de inmunoglobulina de mantenimiento puede ser administrada subcutáneamente en combinación con hialuronidasa, si es necesario, y la dosificación, la forma de dosificación, o la frecuencia de administración, o una combinación de éstas pueden ser modificadas. En algunos casos, un sujeto puede requerir tratamiento intermitente con una base a largo plazo después de cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

1.Inmunodeficiencia Primaria con Deficiencia de Anticuerpos

La inmunoglobulina puede ser usad apara tratar inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos. La inmunodeficiencia primaria abarca muchos trastornos que están caracterizados por una deficiencia de una o más proteínas del sistema inmune. Típicamente, las inmunodeficiencias primarias son trastornos heredados, y muchos se manifiestan por falla en la producción del anticuerpo protector. Por consiguiente, la inmunoglobulina puede ser administrada como terapia de reemplazo de inmunoglobulina para pacientes que se presentan con dichas enfermedades. Ejemplares de inmunodeficiencias primarias incluyen, pero no se limitan a, inmunodeficiencia

variable común (CVID) agamaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia severa combinada (SCID), hipogamaglobulinemia primaria, enfermedades por inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agamaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), hipogamaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebelar paraneoplástica sin anticuerpos. La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa, a pacientes con inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos a dosis similares a las dosis usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina. Las dosis ejemplares incluyen, por ejemplo, entre 100 mg/kg de PC y 800 mg/kg de PC de inmunoglobulina, a intervalos de cuatro semanas. La dosis puede ser incrementada o disminuida, según la frecuencia de las dosis, dependiendo de la respuesta clínica.

2.Hipogamaglobulinemia Secundaria Adquirida en Malignidades Hematológicas

Pacientes con hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas, como leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), linfoma no de Hodgkin (NHL) y otras malignidades relevantes y post-trasplante de células embrionarias hematopoyéticas, son susceptibles a infecciones bacterianas debido a. La

hipogamaglobulinemia es causada por una falta de linfocitos B y a un bajo nivel de anticuerpos en la sangre resultante, y puede ocurrir en pacientes con CLL, MM, NHL y como un resultado tanto de disfunción inmune relacionada con leucemia como a inmunosupresión relacionada con terapia. La deficiencia en la inmunidad humoral es ampliamente responsable por el riesgo creciente de morbilidad y mortalidad relacionada con infección en estos pacientes, especialmente por microorganismos encapsulados. Por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, y Staphylococcus aureus*, así como también *Legionella y Nocardia spp.* son patógenos bacterianos frecuentes que causan pneumonía en pacientes con CLL. También han sido observadas infecciones oportunistas como *Pneumocystitis carinii*, hongos, virus, y micobacterias. El número y severidad de infecciones en estos pacientes puede ser reducido significativamente por administración de inmunoglobulina (Griffiths y colaboradores, (1989) Blood 73:366-368, Chapel y colaboradores (1994) Lancet 343:1059-1063). Por consiguiente a dichos pacientes se les puede administrar inmunoglobulina subcutáneamente en combinación con hialuronidasa usando los métodos descritos en la presente para prevenir infecciones recurrentes. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con

hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas. Por ejemplo, aproximadamente 400 mg/kg de PC de inmunoglobulina, en combinación con hialuronidasa, pueden ser administrados subcutáneamente cada 3 a 4 semanas. En un ejemplo adicional, una dosis adicional de 400 mg/kg de PC pueden ser administrados en el primer mes de terapia cuando la inmunoglobulina del suero del paciente sea inferior a 4 g/litro. La cantidad de inmunoglobulina administrada, y la frecuencia de las dosis, puede ser incrementada o disminuida según sea apropiado.

3.Enfermedad de Kawasaki

La enfermedad de Kawasaki es una enfermedad multi-sistema, febril, aguda de niños y jóvenes que involucra a menudo las arterias coronarias. Es también conocida como síndrome de los ganglios linfáticos, poliarteritis infantil y síndrome de Kawasaki, y es una vasculitis auto-limitada pobremente comprendida que afecta a muchos órganos, incluyendo la piel y membranas mucosas, ganglios linfáticos, paredes de vasos sanguíneos, y el corazón. Puede tener lugar aneurisma de arterias coronarias desde la segunda semana de enfermedad durante la etapa de convalecencia. Aunque la causa de la condición es desconocida, hay evidencia de que las vasculitis característica resulta de una reacción inmune caracterizada por la activación de células T y macrófagos a

un antígeno desconocido, secreción de citoquinas, hiperactividad de células B policlonales, y la formación de auto-anticuerpos en células endoteliales y células de músculo liso. En individuos susceptibles genéticamente, uno o más agentes infecciosos comunes no caracterizados , posiblemente con actividad super-antigénica, pueden activar la enfermedad. La inmunoglobulina administrada previamente en la enfermedad de Kawasaki puede prevenir la patología de la arteria coronaria. La administración subcutánea de inmunoglobulina en combinación con hialuronidasa a pacientes con inflamación en curso asociada con la enfermedad de Kawasaki pueden mejorar los síntomas. Dosificaciones ejemplares incluyen aquellas usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con enfermedad de Kawasaki. Por ejemplo, a un paciente con enfermedad de Kawasaki se le puede administrar aproximadamente 1 - 2 g de inmunoglobulina por kg de peso corporal del paciente. Esta puede ser administrada, por ejemplo, en cuatro dosis de 400 mg/kg de PC por cuatro días consecutivos. En otro ejemplo, 1 g de inmunoglobulina/kg de PC es administrado como una dosis única durante un período de 10 horas. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser incrementada o disminuída según sea apropiado.

4.Polineuropatía Desmielinante Inflamatoria Crónica

La polineuropatía desmielinante inflamatoria

crónica (CIDP) es un trastorno neurológico caracterizado por debilidad progresiva y deterioro de la función sensorial en las piernas y brazos. El trastorno, el cual algunas veces es llamada neuropatía recurrente crónica, es causada por daño a la envolvente de mielina de los nervios periféricos. Aunque puede ocurrir a cualquier edad y en ambos géneros, CIDP es más común en jóvenes adultos y en hombres más que en mujeres. A menudo se presenta con síntomas que incluyen comezón o adormecimiento (que comienza en los dedos de los pies y dedos), debilidad de los brazos y piernas, pérdida de reflejos del tendón profundo (areflexia), fatiga, y sensaciones anormales, CIDP está estrechamente relacionada al síndrome de Guillain-Barre y es considerada la contraparte crónica de esa enfermedad aguda. No hay prueba de diagnóstico específica pro descubrimientos de laboratorio y clínicos característicos ayudan a distinguir este trastorno de otros síndromes neuropáticos inmunomediados. Los estudios indican que el tratamiento con inmunoglobulina reduce los síntomas (van Schaik y colaboradores, (2002) Lancet Neurol. 1: 497-498). Por consiguiente, la inmunoglobulina puede ser co-administrada con hialuronidasa subcutáneamente a pacientes que se presentan con CIDP usando los métodos descritos en la presente. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con

CIDP. En un ejemplo, a un paciente con CIDP se le administró aproximadamente 2 g/kg de PC de inmunoglobulina subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa. Esta puede ser administrada, por ejemplo, en cinco dosis de 400 mg/kg de PC por cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser aumentada o disminuída según sea apropiado.

5.Síndrome de Guillain-Barré

El síndrome de Guillain-Barré es un trastorno autoinmune neurológico que involucra desmielinación inflamatoria de nervios periféricos. Los primeros síntomas incluyen grados variables de debilidad o sensaciones de comezón en las piernas, las cuales pueden extenderse a los brazos y parte superior del cuerpo. Estos síntomas pueden disminuir en intensidad hasta que los músculos no pueden ser usados totalmente y el paciente está casi totalmente paralizado, dando como resultado una condición amenazante de vida. Aunque la recuperación es generalmente buena o completa en la mayoría de pacientes, se ha reportado que tiene lugar una incapacidad persistente en aproximadamente 20 % y muerte en 4 a 15 % de pacientes. El síndrome de Guillain-Barré puede tener lugar unos cuantos días o semanas después de los síntomas de infección viral respiratoria o gastrointestinal. En algunos casos la cirugía o la vacunación pueden activar

el síndrome. El trastorno se puede desarrollar durante el transcurso de horas o días, o puede tomar 3 a 4 semanas. Un aprueba de velocidad de conducción del nervio (NCV) puede dar una pista al doctor para ayudar al diagnóstico. En algunos casos, una punción espinal puede ser usada para diagnóstico ya que el fluido cerebroespinal en pacientes on síndrome de Guillain-Barré típicamente contiene más proteínas que en sujetos normales.

Aunque no hay cura conocida para el síndrome de Guillain-Barré, el tratamiento con inmunoglobulina puede aminorar la severidad de la enfermedad y acelerar la recuperación. La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente a pacientes en combinación con hialuronidasa a una dosis apropiada, como, por ejemplo, una dosis similar a la dosis usada para administrar inmunoglobulina intravenosamente a pacientes con el síndrome de Guillan-Barré. Por ejemplo, a un paciente con el síndrome de Guillain-Barré se le puede administrar aproximadamente 2 g/kg de PC de inmunoglobulina, en combinación con hialuronidasa, subcutáneamente. Esta puede ser administrada, por ejemplo, en cinco dosis de 400 mg/kg de PC por cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser aumentada o disminuída dependiendo de, por ejemplo, la severidad de la enfermedad y la respuesta clínica a la

terapia, la cual puede ser evaluada fácilmente por un experto en el arte.

6.Púrpura Trombocitopénica Idiopática

La Púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) también conocida como púrpura trombocitopénica inmune primaria y púrpura trombocitopénica autoinmune, es una reducción en la cuenta plaquetaria (trombocitopenia) resultante de la supervivencia plaquetaria acortada debido a anticuerpos anti-plaquetas. Cuando las cuentas plaquetarias son muy bajas (por ejemplo $< 30 \times 10^9/L$) puede tener lugar el sangrado en la piel (púrpura) y membranas mucosas. La producción de plaquetas en la médula ósea (megakariopoyesis) en pacientes con ITP es morfológicamente normal. En algunos casos, hay deterioro adicional de la función plaquetaria relacionada con el enlace del anticuerpo a glicoproteínas sobre la superficie plaquetaria. La ITP puede estar presente como formas agudas y crónicas. Aproximadamente 80 % de adultos con ITP tienen la forma crónica de la enfermedad. La máxima incidencia de ITP crónica es en mujeres de 15 a 50 años de edad, aunque algunos reportes sugieren que la incidencia es creciente con la edad. La ITP es relativamente común en pacientes con VIH. Aunque la ITP puede encontrarse en cualquier etapa de la infección, su importancia aumenta cuando la enfermedad de VIH avanza.

Los estudios han demostrado que la inmunoglobulina puede ser usada para tratar a pacientes con ITP (Godeau y colaboradores (1993) Blood 82(5):1415-21, Godeau y colaboradores (1999) Br J Haematol 1999; 107(4):716-9). La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente a pacientes en combinación con hialuronidasa a una dosis similar a la dosis usada para administrar inmunoglobulina intravenosamente, para tratar pacientes con ITP. Por ejemplo, a un paciente con ITP se le puede administrar aproximadamente 1 a 2 g/kg de inmunoglobulina, en combinación con hialuronidasa, subcutáneamente. Esta puede ser administrada durante varios días, o puede ser administrada en una dosis. En algunos ejemplos, cinco dosis de 400 mg/kg de PC de inmunoglobulina es administrada por 1 - 2 días consecutivos, dependiendo de la cuenta plaquetaria y de la respuesta clínica. La cantidad de inmunoglobulina administrada, y la frecuencia de las dosis, puede ser aumentada o disminuida dependiendo de, por ejemplo, la cuenta plaquetaria y lla respuesta clínica a la terapia, la cual puede ser fácilmente evaluada por un experto en el arte.

7.Miopatías Inflamatorias: Polimiositis, dermatomiositis y miositis corporal por inclusión.

Las miopatías inflamatorias son un grupo de enfermedades musculares que involucran la inflamación y la

degeneración de tejidos del músculo esquelético. Estos trastornos son adquiridos y todos están presentes con significativa debilidad muscular y la presencia de una respuesta inflamatoria en el músculo. La dermatomiositis (DM) es la más fácilmente reconocida de las miopatías inflamatorias debido a su sarpullido distintivo, el cual ocurre como un sarpullido por zonas, oscuro, rojizo o lila sobre los párpados, mejillas y el puente nasal, , y sobre la espalda o parte superior del tórax, codos, rodillas y nudillos. En algunos pacientes, ganglios calcificados o barriga endurecida se desarrolla bajo la piel. El sarpullido a menudo precede a la debilidad muscular, la cual típicamente se desarrolla durante un período de semanas pero puede desarrollarse durante meses o aún días. La dermatomiositis puede tener lugar a cualquier edad desde la niñez a la adultez y es más común en hembras que en machos. Aproximadamente un tercio de pacientes con DM reporta dificultades para tragar. Dolor y ablandamiento muscular, generalmente ocurren en menos de 25 % de adultos con DM, pero más de 50 % de niños con DM se quejan de dolor y ablandamiento muscular.

La Polimiositis no tiene el sarpullido característico de la dermatomiositis, y el principio de la debilidad muscular usualmente progresa más lento que en DM.

Muchos pacientes de PM presentes tienen dificultad para tragar. En algunos casos, los pacientes también tienen dificultad para respirar debido a falla muscular. Tantos como un tercio de pacientes de PM tienen dolor muscular, PM. La enfermedad afecta a más mujeres que hombres, y raramente afecta a gente con edad inferior a 20 años, aunque se han reportado casos de polimiositis de la infancia y de la niñez.

La miositis corporal por inclusión (IBM) es muy similar a la polimiositis. El principio de la debilidad muscular en IBM es usualmente muy gradual, teniendo lugar durante meses o años. Es diferente de PM en que ambos músculos distal y proximal son afectados mientras que generalmente solamente los músculos proximales son afectados en PM. Encuentros típicos incluyen debilidad de los flexores de la muñeca y de los flexores de los dedos. La atrofia del antebrazo es característica de la enfermedad, y atrofia del músculo cuadríceps es común con grados variables de debilidad en otros músculos. Aproximadamente la mitad de los pacientes afligidos con IBM tienen dificultad para tragar. Los síntomas de IBM usualmente comienzan después de la edad de 50 años, aunque ningún grupo de edad es excluido. La IBM tiene lugar más frecuentemente en hombres que en mujeres. Aproximadamente uno en diez casos de IBM puede ser hereditaria.

Los estudios indican que la administración de

inmunoglobulina puede beneficiar a pacientes con estas miopatías inflamatorias. La inmunoglobulina puede mejorar la fortaleza muscular, reducir la inflamación y reducir el progreso y la severidad de la enfermedad (Dalakas y colaboradores (1993) N Engl J Med 329(27): 1993-2000; Dalakas y colaboradores (2001) Neurology 56(3):323.7, Dalakas (2004) Pharmacol Ther 102(3):177-93, Walter y colaboradores (2000) J Neurol 247(1):22-8). La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente a pacientes con DM, PM o IBM en combinación con hialuronidasa a una dosis similar a la dosis usada para administra inunoglobulina intravenosamente. Por ejemplo, 2 g/kg de PC de inmunoglobulina pueden ser administrados, típicamente durante varios días, como, por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg de PC en días consecutivos.

8.Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton

El síndrome miasténico de Lambert Eaton (LEMS) es un raro trastorno inmune de transmisión neuromuscular primero reconocido clínicamente en asociación con cáncer de pulmón y subsecuentemente en casos en los cuales no se detectó ningún neoplasma. Pacientes con LEMS tienen un defecto en la articulación neuromuscular presináptica. La enfermedad está caracterizada clínicamente por debilidad del músculo proximal con aumento de la fuerza después de ejercicio, signos óculomotores ligeros, reflejos del tendón profundo

disminuidos y disfunción autonómica (boca seca, constipación, falla eréctil). La administración subcutánea de inmunoglobulina en combinación con hialuronidasa a pacientes con LEMS puede mejorar los síntomas. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina apacientes con LEMS. Por ejemplo, a un paciente con LEMS se le pueden administrar 2 g de inmunoglobulina por kg de peso corporal del paciente en varias dosis. Por ejemplo, cinco dosis de 400 mg de inmunoglobulina por kg de peso corporal pueden ser administradas en cinco días consecutivos. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser aumentada o disminuída según sea apropiado.

9.Neuropatía Motora Multifocal

La neuropatía motora multifocal (MMN) con bloqueo de conducción es una neuropatía desmielinante inmuno mediada adquirida con debilidad progresiva lentamente, fasciculaciones, y calambres, sin implicaciones sensoriales significativas. La duración de la enfermedad antes de diagnóstico varía en intervalos de diagnóstico desde varios meses a más de 15 años. La causa precisa de MMN es desconocida. Estudios histopatológicos y de electrodiagnóstico demuestran la presencia de ambos daños, axonal y desmielinante. Los nervios motores son afectados

primeramente, aunque también se ha demostrado ligera desmielinación en nervios sensoriales. La eficiencia del tratamiento inmunomodulador e inmunosupresor apoya adicionalmente la naturaleza inmune de MMN. Los títulos de anticuerpos anti-GM1 son elevados en más de la mitad de los pacientes con MMN. Aunque el papel de los anticuerpos anti-GM1 en la enfermedad es desconocido, su presencia puede ser usada como un marcador de diagnóstico para MMN.

La administración subcutánea de inmunoglobulina en combinación con hialuronidasa a pacientes con MMN puede mejorar los síntomas. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con MMN. Por ejemplo, a un paciente con MMN se le puede administrar 2 g de inmunoglobulina por kg de peso corporal en varias dosis. Por ejemplo, cinco dosis de 400 mg de inmunoglobulina por kg de peso corporal pueden ser administrados en cinco días consecutivos. En otro ejemplo, pueden administrarse 1 g/kg de peso corporal en 2 días consecutivos. A algunos pacientes se les puede dar terapia de mantenimiento, la cual puede incluir, por ejemplo, dosis de 400 mg/kg de peso corporal a 2 g/kg de peso corporal, dados cada 2 - 6 semanas. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser aumentada o disminuida según sea apropiado tomando en cuenta la respuesta de los pacientes.

10.Miastenia Gravis

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad neuromuscular autoinmune crónica caracterizada pro grados variables de debilidad de los músculos esqueléticos del cuerpo. Esta asociada con la presencia de anticuerpos a receptores de acetilcolina (AchR) o a tirosina quinasa específica de músculo (MuSK) en la articulación neuromuscular, aunque algunos pacientes son negativos al anticuerpo. Las características clínicas de MG incluyen debilidad fluctuante y fatigabilidad de músculos voluntarios, particularmente músculos elevadores de los párpados, extraoculares, bulbares, de los miembros y respiratorios. Los pacientes usualmente se presentan con caída de párpados unilateral o bilateral (ptosis) doble visión (diplopia), dificultad para tragar (disfagia) y debilidad del músculo proximal. La debilidad de los músculos respiratorios pueden dar como resultado falla respiratoria en casos severos o en exacerbaciones severas agudas (crisis miasténica). La miastenia gravis ocurre en todos los grupos étnicos y en ambos géneros. Más comúnmente afecta a mujeres adultas jóvenes de menos de 40 años y a hombres de edad avanzada de más de 60 años pero puede ocurrir a cualquier edad. En algunos casos, es efectuada la timectomía para reducir los síntomas.

La inmunoglobulina puede ser usada, por ejemplo, como terapia de mantenimiento para pacientes con MG moderada a severa, típicamente cuando otros tratamientos han sido inefectivos o han causado severos efectos secundarios, y también puede ser administrada antes de la timectomía o durante una exacerbación aguda de la enfermedad (crisis miasténica). La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa, a pacientes con miastenia gravis usando los métodos descritos en la presente. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunoglobulina a pacientes con MG. Por ejemplo, a un paciente con MG se le pueden administrar dosis de 400 mg/kg de peso corporal a 2 g/kg de peso corporal cada 4 -6 semanas para terapia de mantenimiento. Antes de timectomía o durante crisis miasténica, 1 - 2 g/kg de peso corporal pueden ser administrados en varias dosis, como, por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg de peso corporal en cinco días consecutivos. En otro ejemplo, 1 g/kg de peso corporal pueden ser administrados en 2 días consecutivos.

11.Síndrome de Moersch-Woltmann

El síndrome de Moersch-Woltmann, también conocido como síndrome de la persona rígida o síndrome del hombre rígido, es un raro trastorno neurológico con características

de una enfermedad autoinmune. Los pacientes se presentan con síntomas relacionados con rigidez muscular y espasmos episódicos superpuestos. La rigidez muscular se extiende para involucrar los músculos axiales, primeramente abdominal y tóracolumbar, así como también músculos de los miembros proximales. Típicamente, la co-contracción de músculos agonistas y antagonistas truncales conduce a una apariencia como tabla con hiperlordosis. Menos frecuentemente, la implicación del músculo respiratorio conduce a la dificultad respiratoria y la implicación del músculo facial a una cara como máscara. El tratamiento con inmunoglobulina puede efectuar rigidez disminuída y evaluaciones de sensibilidad elevadas en pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann (Dalakas y colaboradores (2001) N Engl J Med 345(26):1870-6). La inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa, a pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann usando los métodos descritos en la presente. Dosificaciones ejemplares incluyen las usadas para administración intravenosa de inmunolgobulina a pacientes con síndrome de Moersch-Woltmann. Por ejemplo, la inmunoglobulina puede ser administrada a dosis de 400 mg/kg de peso corporal en cinco días consecutivos. A algunos pacientes se les puede dar terapia de mantenimiento, la cual puede incluir por ejemplo, 1 - 2 g de inmunolgobulina por kg de peso corporal

cada 4 - 6 semanas. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede ser aumentada o disminuída según sea apropiado.

12.Enfermedad de Alzheimer

El tratamiento para la enfermedad de Alzheimer incluye tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (véase por ejemplo, Dodel y colaboradores (2004) J Neurol Neurosurg. Psychiatry, 75: 1472-4; Solomon y colaboradores (2007) Curr. Opin. Mol. Ther., 9:79-85; Relkin y colaboradores (2008) Neurobiol Aging). La IG contiene anticuerpos que enlazan al beta amiloide (AB), el cual es un componente central de la placa en los cerebros de pacientes de Alzheimer. Por consiguiente, la IG puede ayudar a promover la eliminación de AB desde el cerebro y bloquear los efectos tóxicos de AB's en las células cerebrales. Por lo tanto, la inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa, a pacientes con enfermedad de Alzheimer usando los métodos descritos en la presente. Los sujetos a ser tratados incluyen pacientes que tienen enfermedad de Alzheimer ligera, moderada o avanzada. Esta en el nivel de la experiencia de un médico tratante identificar a pacientes para tratamiento. La imunoglobulina en combinación con hialuronidasa puede ser administrada cada semana, cada dos semanas o una vez al mes. El tratamiento puede continuar

durante el transcurso de meses o años. La IG puede ser administrada a dosis de o entre 200 mg/kg de PC a 2 mg/kg de PC cada semana o cada dos semanas, y generalmente al menos 200 mg/kg a 2 g/kg de PC al menos una vez al mes. El tratamiento con inmunoglobulina puede efectuar un incremento en los niveles del anticuerpo anti-beta-amiloide de pacientes en comparación con los niveles antes de tratamiento.

13.Otras Enfermedades y Condiciones

Los datos clínicos indican que la inmunoglobulina puede ser usada en el tratamiento de muchas condiciones. En algunos casos, la inmunoglobulina puede ser usada en el tratamiento primario, mientras que en otros casos, es administrada como terapia de segunda línea cuando las terapias estándares han probado no ser efectivas, se han vuelto intolerables o son contra-indicadas. Está en la experiencia de un médico tratante identificar dichas enfermedades o condiciones. Ejemplares de éstas incluyen, pero no se limitan a, hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada positiva a ANCA; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-

maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT); enfermedad de Alzheimer, síndrome hematofagocítico; trasplante de células embrionarias hematopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatía paraproteinémica de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia por opsoclonus mioclonus; penfigo foliáceo; penfigo vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de choque tóxico; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; trasplante de médula ósea; tumores por células T; y traumatismo.

También se ha mostrado que la inmunoglobulina tiene actividad antimicrobiana contra numerosas infecciones bacterianas, virales y fúngicas, incluyendo, pero no limitándose a, Haemophilus influenzae de tipo B, Pseudomonas aeruginosas de tipos A y B, Staphylococcus aureus, Streptococcus del Grupo B, Streptococcus penumoniae de los tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19 y 23, Adenovirus de los tipos 2 y 5, Citomegalovirus, virus de Epstein Barr, VCA, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, influenza A, tosferina, parainfluenza de los tipos 1, 2 y 3, Polio, virus del herpes zóster, varicela, Aspergillus y Candida albicans. Por consiguiente, la inmunoglobulina puede ser administrada subcutáneamente en combinación con hialuronidasa a pacientes

con infecciones bacterianas, virales y fúngicas para aumentar el sistema inmune del paciente y tratar la enfermedad. En algunos ejemplos, también son administrados antibióticos u otros antimicrobianos.

I.Artículos de Fabricación y Equipos

Las composiciones farmacéuticas de inmunoglobulina y una hialuronidasa soluble, proporcionadas juntas o separadamente, pueden ser empacadas como artículos de fabricación que contengan material de empaque, una composición farmacéutica la cual sea efectiva para tratar una enfermedad o condición tratable con IG, y una etiqueta que indique que la composición y las combinaciones son para ser usadas para tratar enfermedades y condiciones tratables con IG. Ejemplares de artículos de fabricación son contenedores incluyendo contenedores de cámara individual y de cámara dual. Los contenedores incluyen, pero o se limitan a, tubos, botellas y jeringas. Los contenedores pueden incluir adicionalmente una aguja para administración subcutánea.

Los artículos de fabricación proporcionados en la presente contienen materiales de empaque. Los materiales de empaque para uso al empacar productos farmacéuticos son bien conocidos para el experto en el arte. Véase por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5,323,907, 5,033,252 y 5,052,558, cada una de las cuales es incorporada íntegramente a la presente.

Ejemplos de materiales de empaque farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, empaques vesiculares, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, frasquitos, contenedores, jeringas, botellas, y cualquier material de empaque adecuado para una formulación seleccionada y el modo previsto de administración y tratamiento. Un amplio grupo de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionadas en la presente son contemplados cuando son una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad o condición tratable por IG.

Las composiciones de inmunoglobulina y de hialuronidasa soluble, proporcionadas juntas o separadamente, también pueden ser proporcionadas en equipos. Los equipos pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente y un artículo para administración. Por ejemplo las composiciones pueden ser suministradas con un dispositivo para administración, como una jeringa, un inhalador, un recipiente de dosificación, un gotero, o un aplicador. El equipo puede incluir, opcionalmente, instrucciones para aplicación incluyendo dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para modos de administración. Los equipos pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente y un artículo para diagnóstico. Por ejemplo, dichos equipos incluyen un artículo para medir la

concentración , cantidad o actividad de la IG.

J. EJEMPLOS

Se incluyen los siguientes ejemplos para propósitos ilustrativos solamente y no se pretende limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

PH20 recombinante Humana Soluble (rHuPH20) Facilita la Administración Subcutánea de Inmunoglobulina (IG) y la Biodisponibilidad

La administración subcutánea (SC) de inmunoglobulina (IG) da como resultado la biodisponibilidad reducida en comparación con la administración intravenosa (IV). Un estudio reportó 63 % de biodisponibilidad en comparación con la administración IV, requiriéndose así una dosis de 137 % de la dosis IV a ser usada para lograr una biodisponibilidad equivalente, es decir, el área bajo la curva (AUC) de tiempo-concentración (Ochs y colaboradores (2006) J Clin. Immunol., 26:265-273). Por consiguiente, se efectuaron experimentos para determinar si la administración de IG (GAMMAGARD LIQUID (GGL), Baxter Biosciences) en la presencia de PH20 recombinante humana soluble (rHuPH20) incrementó la biodisponibilidad de IG después de administración SC de IG, poniendo en evidencia la necesidad de dosis crecientes. El estudio experimental fue diseñado

para evaluar 1) la habilidad de los sujetos para tolerar una dosis mensualmente de GGL en un sitio único vía la ruta subcutánea (SC); 2)la dosis de rHuPH20 por gramo de GGL requerida para tolerar una dosis mensualmente de GGL, con no más que ligeras reacciones adversas locales al fármaco; 3)el tiempo requerido para administración SC; y 4)una comparación de la biodisponibilidad medida por medio del área bajo la curva (AUC) de GGL IV versus SC.

Resumiendo, fueron enrolados en el estudio once pacientes adultos inmunodeficientes quienes estuvieron sobre dosis estables de gamaglobulina intravenosa (IVIG). Todos los pacientes permanecieron sobre las mismas dosis mensuales de IVIG que recibieron antes del estudio. Para administración subcutánea, los pacientes que habían recibido hasta 600 mg/kg de PC de GGL cada cuatro semanas IV, recibieron infusiones SC en un sitio único comenzando a una dosis que fue un cuarto de la dosis IV durante IV semanas, es decir una dosis por semana, para determinar la dosis de rHuPH20 requerida para tolerar una dosis a la semana. Subsecuentemente, dosificaciones de rHuPH20 fueron reducidas y los pacientes recibieron la 2, 3, y finalmente una dosis total de GGL la cuarta semana para determinar la rHuPH20 mínima requerida para tolerar una infusión una vez al mes de GGL SC.

505

Las infusiones iniciales se condujeron usando 150 U de rHuPH20 por gramo de GGL. La rHuPH20 fue administrada a través de una aguja SC calibre 24 a una concentración de 150 U/mL o 1500 U/mL a una velocidad de 1 - 2 mL/min, antes de la infusión de GGL. Si se usaron 1500 U/mL de rHuPH20, se diluyó como sigue: a) si el volumen de la solución concentrada de rHuPH20 (1500 U/mL) necesitado fue de 1.5 mL o menos, fue diluida 1:10 usando solución salina inyectable normal; b) si el volumen del concentrado necesitado de rHuPH20 (1500 U/mL) fue superior a 1.5 mL pero inferior a 15 mL, se diluyó a 15 litros con solución salina inyectable normal; si el volumen de la solución de rHuPH20 concentrada (1500 U/mL) necesitado fue 15 mL o más, se usó sin diluir.

Inmediatamente después de la infusión de rHuPH20 (y en 5 minutos), la GGl fue infusionada a través de la misma aguja SC calibre 24 que comenzó a una dosis que fue un cuarto de la dosis cada 4 semanas (es decir 1 dosis por semana) para determinar la cantidad de rHuPH20 necesitada para dar un cuarto de la dosis de 4 semanas en un sitio único. Cada paciente fue evaluado para determinar si la infusión fue tolerada ; se juzgó que la infusión no fue tolerada si hubo reacciones locales moderadas o severas que requieran más de un sitio de administración o una incapacidad para terminar la infusión en menos de 3 horas. Si la dosis semanal de GGl fue

tolerada, la mitad de la dosis (dos dosis por semana) fue administrada usando rHuPH20 a 100 U/g de GGL, y la dosis de rHuPH20 fue adicionalmente reducida a 66 U/g de GGL, luego 50 U/g de GGL. La dosis de rHuPH20 se repitió, sobre una base por gramo de GGL, con cantidades crecientes de GGL hasta una dosis de GGL total a 4 semanas, fue tolerada en un sitio único. Si la cantidad de rHuPH20 no fue tolerada en cualquier punto, entonces se repitió la dosis semanalmente de GGl en el siguiente intervalo y la cantidad de rHuPH20 fue incrementada hasta que la dosis fue tolerada. Si un sujeto falla en tolerar una dosis por dos incrementos sucesivos en la dosis de rHuPH20 (es decir, 3 intentos a una dosis distinta de GGL), entonces se determinó que la dosis tolerada previamente fue la dosis máxima tolerada.

Los primeros cuatro pacientes fueron evaluados para tolerancia solamente; los últimos 7 pacientes tuvieron una infusión IV, seguida por un estudio farmacocinético (PK) para comparar la infusión IV con las infusiones SC subsecuentes. Para las infusiones SC, después de que s e logró una administración de dosis de GGL mensualmente, se repitió la misma dosis mensualmente y se efectuó un estudio PK para evaluar la T1/2, Tmax, y AUC. Si AUC(SC) no estuvo en el 90 % de la AUC(IV), la dosis de rHuPH20 fue incrementada 4 veces en la siguiente infusión, y se repitió la evaluación PK.

Diez de los 11 pacientes lograron dosis mensuales de 25.5 a 61.2 gramos de GGL (255 a 612 mL) en un sitio SC único, a velocidades de 120 a 300 mL/hora. El onceavo paciente se lo retiró después de la infusión en la primera semana manifestando incomodidad local: Para el primer paciente (39001), las infusiones iniciales fueron hechas por gravedad, no obstante, las velocidades no fueron aceptables incrementando la dosis de rHuPH20 desde 150 a 300 U/g de GGL. Por consiguiente, todas las infusiones subsecuentes fueron hechas usando una bomba peristáltica para IV. Los 9 pacientes restantes lograron la dosis de GGl mensualmente sin la necesidad de repetir dosis o de incrementar la concentración de rHuPH20. Por consiguiente, los 9 pacientes en quienes se hizo un intento de reducir la dosis de rHuPH20 completaron el estudio y fueron capaces de tolerar las infusiones usando 50 U/g de GGL. Para determinar si 50 U/g de GGL fue la rHuPH20 mínima que podía ser administrada., una dosis de 25 U/g de GGL se intentó en dos pacientes sin éxito: uno tuvo incomodidad y el otro tuvo tolerancia reducida y requirió administración en dos sitios. Por consiguiente, la cantidad mínima de rHuPH20 que permitió una administración de dosis mensualmente de GGL SC fue de 50 U/g de GGL. Los resultados se resumen en la Tabla 3 siguiente. Los resultados mostraron que los primeros dos pacientes fueron infusionados

a velocidades de hasta 300 mL/hr con tiempos de infusión de 1.64 h (270 mL) a 3.55 h (537 mL). La velocidad de administración estuvo limitada primeramente por el tipo de bomba usada. La bomba para IV frecuentemente alarmó con velocidades de infusión rápidas. Una infusión se hizo lenta y una fue interrumpida debido a dolor ligero en el sitio de infusión. Ambas infusiones se abreviaron y fueron terminadas.

Tabla 3: Parámetros de Infusión para Pacientes que Completaron Exitosamente Infusiones SC Mensuales

A	B	C	D	E	F	G
390001	1	25.5	255	305.9	175	2.13
390003	1	30.1	301	46.9	200	2.38
400001	1	44.5	445	49.8	300	3.05
340001	3	30.3	303	52.5	300	3.02
340002	4	39.9	399	50.0	300	3.20
390004	4	29.3	293	50.8	300	1.92
390005	3	27.2	272	50.6	300	1.64
390006	3	61.4	614	50.0	300	2.75
400002	3	53.7	537	51.5	300	3.55
400003	3	42.1	421	48.8	300	2.29

A = Sujetos (N = 10)

B = Número de infusiones de dosis mensuales

C = IgG (g) por dosis infusionada (media)

D = Volumen (mL) de IgG infusionado (media)

E = Concentración final de rHuPH20 (U/g)

F = Velocidad máxima de infusión (mL/hr)

G = Tiempo (horas) para infusionar (media)

1.Evaluación de la Tolerancia

Los sujetos fueron evaluados por su tolerancia a las infusiones SC. La mayoría de las infusiones fueron asociadas solamente con reacciones ligeras relacionadas con la infusión (tabla 4). La mayoría de las reacciones ligeras comunes fueron eritema, dolor, hinchazón, ardor y prurito en el sitio de infusión. Las reacciones moderadas en el sitio de infusión incluyeron tres casos de dolor, y un caso cada uno de prurito, hinchazón y ardor. No se reportaron reacciones severas. Hubieron quejas de ardor transitorio durante la infusión de la rHuPH20 en 10 de las infusiones, con cinco que tuvieron lugar en un paciente.

Tabla 4: Eventos Adversos Independientemente de la Causalidad, por Períodos Correspondientes a Categorías de Dosis

Clase de Organo del Sistema MeDRA	¼ dosis SC	½ dosis SC	¼ dosis SC	Dosis SC total
Trastornos del oído y del laberinto	0	0	0	1
Trastornos oculares	0	1	0	3
Trastornos gastrointestinales	0	1	0	2
Trastornos generales y condiciones del sitio de administración	26	15	20	29

Tabla 4 (Continuación)

Clase de Organo del Sistema MeDRA	¼ dosis SC	½ dosis SC	¼ dosis SC	Dosis SC total
Trastornos del sistema inmune	0	0	0	1
Infecciones e infestaciones	1	1	1	3
Trastornos del tejido conectivo y músculoesquelético	1	1	1	0
Trastornos del sistema nervioso	2	1	0	0
Trastornos respiratorios, torácicos y mediastinales	0	0	0	4
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo	0	0	3	1
Total	30	20	25	44

Los eventos adversos generalizados relacionados con las infusiones que se consideran posibles o probables se enlistan en la Tabla 5. Fueron tres moderados y ninguno fue severo. Solamente el episodio de ligero dolor de pecho estaba asociado con la interrupción de la infusión, pero la infusión fue terminada y las infusiones subsecuentes fueron bien toleradas. La Tabla 6 expone la proporción de infusiones subcutáneas que fueron terminadas sin interrupción por un evento adverso.

511

Un evento adverso serio, una reacción anafiláctica, tuvo lugar en un paciente, no relacionado con la terapia de estudio. El paciente, quien tuvo una historia de reacciones alérgicas previas a antibióticos, recibió un antibiótico el día siguiente de su infusión con GGL/rHuPH20, y subsecuentemente se desarrolló la anafilaxia. Este paciente se recuperó completamente y fue capaz de terminar exitosamente el estudio.

No hubo infecciones bacterianas documentadas durante este ensayo de pacientes de PID. Hubieron 9 casos reportados de infecciones virales, se juzgó que todas no se relacionaron con la terapia de estudio: 2 casos de gastroenteritis viral, 1 caso de queratitis herpética, 2 casos de sinusitis, 1 caso de conjuntivitis y 3 casos (en un paciente) de enfermedad similar a la influenza.

Tabla 5: Eventos Adversos generalizados, no serios, relacionados

Evento adverso en términos de MEDRA	Ligero	Moderado	Severo	Total
Ojos secos	1	0	0	1
Sudoración nocturna	1	0	0	1
Malestar musculoesquelético	0	1	0	1
Jaqueca	1	2	0	3
Letargia	1	0	0	1
Dolor de pecho	1	0	0	1
Edema periférico	1	0	0	1
Dolor	1	0	0	1
Dolor de espalda	2	0	0	2
Total de eventos adversos	9	3	0	12

Tabla 6: Proporción de Infusiones SC Completadas sin Interrupción por un Evento Adverso

Paciente	Sin interrupción	Por ciento (%)	Interrumpida	Detenida	Por ciento (%)	Infusiones totales
390001	4	80	1*	0	20	5
390002	2	100	0	0	0	2
390003	4	100	0	0	0	4
400001	4	100	0	0	0	4
340001	6	100	0	0	0	6
340002	6	86	1**	0	14	7
390004	7	100	0	0	0	7
390005	7	100	0	0	0	7
390006	6	100	0	0	0	6
400002	6	100	0	0	0	6
400003	7	100	0	0	0	7
Total	59	N/A	2	0	N/A	61

*Interrumpida debido a dolor ligero en el sitio de infusión

**Interrumpida debido a ligero dolor de pecho transitorio

2.Evaluación Farmacocinética

Se efectuaron análisis farmacocinéticos sobre niveles de IgG en suero. Los siete pacientes enrolados en la fase de evaluación PK de este estudio lograron dosis mensuales de 27 a 61 gramos de GGL en un sitio único usando

50 U de rHuPH20 por gramo de GGL (véase la Tabla 3). El estudio PK fue efectuado después de recibir una segunda dosis mensual de infusión de GGL. Se colectaron muestras de suero pre-infusión, 1 hora post-infusión y en los días 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 21 y 28 (si se programaron 28 días) post-infusión. Los parámetros farmacocinéticos de los 7 pacientes se exponen en la Tabla 7. Las proporciones de AUC(SC) a AUC(IV) para los 7 pacientes se muestran en la Tabla 8. Los resultados muestran que cinco de los 7 pacientes tuvieron AUC(SC) en 90 % de la AUC(IV). Incrementando la dosis o rHuPH20 cuatro veces en los 2 sujetos con una proporción de menos de 90 % no hubo mejora adicional en la biodisponibilidad.

Tabla 7: Parámetros Farmacocinéticos de Sujetos Individuales

Pacientes	AUC (días*g/l)	$T_{1/2}$ (días	T_{max} (días)	C_{min} (g/l)
34001	461.2	61.3	3.0	12.9
34002*	387.1	114.1	4.9	11.3
	356.7	43.9	4.0	11.3
39004*	256.9	113.8	5.0	7.9
	264.2	44.3	6.9	7.7
39005	369.6	59.3	3.1	10.9
39006	368.9	40.3	4.8	10.8
40002	375.2	33.7	6.8	10.6
40003	356.2	37.9	4.9	9.7
Media	368.0	43.93	4.8	10.8

*Pacientes con evaluaciones PK repetidas después de administración con una dosis creciente de rHuPH20.

Tabla 8: Proporciones de $AUC_{(SC)}$ a $AUC_{(IV)}$ (%)

	Concentración de rHuPH20	
Paciente	50 U/g	200 U/g
34001	101.0	N/A
34002	8.5	79.6
39004	75.8	77.8
39005	102.7	N/A
39006	94.7	N/A
40002	97.3	N/A
40003	90.5	N/A
Media	92.6	N/A

3. Resumen de Resultados

El uso de rHuPH20 por inyección antes de infusión con GGL hace posible infusionar tanto como 600 mL de GGL en un sitio subcutáneo único a velocidades de infusión de hasta 300 mL por hora en este estudio. La velocidad fue limitada primeramente por las bombas IV que fueron usadas, las cuales son diseñadas para iniciar la alerta y detenerse cuando hay infiltración IV y la presión aumenta. Aunque la bomba se interrumpe, esto no ocurre hasta que las velocidades se

aproximan a 300 mL/h, la necesidad de re-iniciar la bomba incrementa el tiempo de infusión. Ya que no hay necesidad de alarmas de presión para administración subcutánea, el problema de interrupción debería de eliminarse conectándose a bombas capaces de generar más presión sin alertas.

Aunque la mayoría de las infusiones fueron asociadas con alguna hinchazón, enrojecimiento u ocasionalmente dolor o sarpullido, todas excepto unos cuantos fueron ligeras. Dos de las seis reacciones moderadas ocurrieron en infusiones donde la rHuPH20 fue reducida en un esfuerzo por encontrar la dosis mínima efectiva; La dosis de rHuPH20 de 50 U/g de GGL fue tolerada por 10 de los 11 sujetos. Un sujeto que no había experimentado previamente infusiones subcutáneas, se le retiró después de la primera dosis semanal que citó incomodidad en el sitio del abdomen inferior. Todas las otras infusiones fueron completadas a pesar de reacciones ligeras, con 97 % de las infusiones que fueron completadas sin interrupción. La mayoría de las reacciones fueron tratadas con compresas frías y solamente unos cuantos requirieron acetaminofeno o difenhidramina.

La biodisponibilidad media de GGL después de administrarla subcutáneamente en combinación con rHuPH20 fue de 92 % de la biodisponibilidad de GGL después de administración IV. Este estudio sugiere que la difusión

creciente produjo la absorción mejorada de rHuPH20 de GGL.

Adicionalmente, los niveles mínimos logrados por medio de la dosificación subcutánea mensual de GGL en este estudio son idénticos a los logrados por administración IV. Por consiguiente, no hay necesidad de incrementar la frecuencia de administración de GGL por dosificación subcutánea versus la dosificación IV; la administración subcutánea de GGL en combinación con rHuPH20 requiere solamente un sitio SC único y puede ser lograda a velocidades de infusión de hasta 300 mL/h.

En conclusión, rHuPH20 facilitó la administración de una dosis total mensual de GGL en un solo sitio a velocidades de hasta 300 mL/h en un grupo de sujetos adultos inmunodeficientes. La biodisponibilidad de la combinación fue de 92 % de la biodisponibilidad IV, con base en la AUC del la curva del tiempo versus la concentración de IgG. Esto sugiere que rHuPH20 mejora la absorción de GGL administrada subcutáneamente. La mayoría de los efectos secundarios locales fueron ligeros y no dieron como resultado la lentitud o la interrupción de las infusiones.

Ejemplo 2

Generación de una línea celular que expresa a rHuPH20 soluble

Se usó el plásmido HZ24 (expuesto en la SEC ID NO: 52) para transfectar a células de Ovario de Cobayo (células

de CHO) (véase por ejemplo las solicitudes Nos. 10,795,095, 11/065,716 y 11/238,171). El vector plásmido HZ24 para expresión de rHuPH20 contiene una estructura principal del vector pCI (Promega), ADN que codifica a los aminoácidos 1-482 de la hialuronidasa PH20 humana (SEC ID NO: 49), un sitio de entrada ribosómica interna (IRES, siglas del inglés Internal Ribosomal Entry Site) del virus de ECMV (Clontech), y el gen de dihidrofoliato reductasa de ratón (DHFR). La estructura principal del vector pCI también incluye ADN que codifica al gen de la resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un orígen f1 de replicación, una región promotora/mejoradora precoz inmediata del citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico, y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El ADN que codifica a la construcción rHuPH20 soluble contiene un sitio NheI y una secuencia consensus de Kozac previa al ADN que codifica a la metionina en la posición 1 del aminoácido de la secuencia señal de 35 aminoácidos de PH20 humana, y un codón de detención después del ADN que codifica a la tirosina correspondiente en la posición del aminoácido 482 de la hialuronidasa PH20 humana expuesta en la SEC ID NO:1), seguido por un sitio de restricción BamHI. La construcción pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por consiguiente, da como resultado una especie de mARN individual activada por el promotor de CMV que codifica a los

aminoácidos 1-482 de PH20 humana (expuesta en la SEC ID NO: 3) y a los aminoácidos 1-186 de la dihidrofoliato reductasa de ratón (expuestos en la SEC ID NO: 53), separados por el sitio de entrada ribosómica interno (IRES).

Células DG44 de CHO no transfectadas que crecieron en medio CD-CHO Modificado de Gibco para células DHFR (-), suplementado con 4 mM de Glutamina y 18 mL/L de Plurionic F68/L (Gibco), fueron sembradas a 0.5 x 10^6 células/mL en un frasco agitador en preparación para transfección. Las células fueron desarrolladas a 37 °C en CO_2 a 5 % en una incubadora humidificada, sacudiendo a 120 rpm. Las células DG4 de CHO no transfectadas que crecieron exponencialmente fueron probadas para viabilidad antes de transfección.

Sesenta millones de célula viables del cultivo de células DG44 de CHO no transfectadas fueron compactadas y resuspendidas a una densidad de 2 x 10^7 células en 0.7 mL de 2x el regulador de transfección (2x HeBS: 40 mM de Hepes, pH de 7.0, 274 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 1.4 mM de Na_2HPO_4, 12 mM de dextrosa). A cada alícuota de células resuspendidas, se añadieron 0.09 mL (250 µg) del plásmido HZ24 lineal (linealizado por digestión durante toda la noche con Cla I (New England Biolabs), y las soluciones de células/ADN fueron transferidas en cubetas de electroporación BTX de espacio de 0.4 cm (Gentronics) a temperatura ambiente. Se efectuó una

electroporación de control negativo sin ADN plásmido mezclado con las células. Las mezclas de células/plásmido fueron electroporadas con una descarga capacitora de 330 V y 960 μF o a 350 V y 960 μF.

Las células fueron retiradas de las cubetas después de electroporación y fueron transferidas en 5 mL de medio CD-CHO Modificado para células DHFR (-), suplementado con 4 nM de Glutamina y 18 mL/L de Plurionic F68/L (Gibco), y se dejaron crecer en un pocillo de una placa para cultivo de tejido de 6 pocillos sin selección por 2 días a 37 °C en una incubadora humidificada, con CO_2 al 5 %.

Dos días post-electroporación, se removieron 0.5 mL de medio para cultivo de tejido de cada pocillo y se probaron para la presencia de actividad hialuronidasa, usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 3.

Tabla 9: Actividad Hialuronidasa Inicial de Células DG44 de CHO Transfectadas en HZ24 a 40 Horas Post-Transfección

	Dilución	Actividad, Unidades/mL
Transfección 1, 330 V	1 a 10	0.25
Transfección 2, 350 V	1 a 10	0.52
Control negativo	1 a 10	0.015

Las células de la Transfección 2 (350 V) fueron colectadas del pocillo de cultivo de tejido, fueron contadas y diluidas a 1 x 10^4 a 2 x 10^4 células viables por mL. Se

transfirieron 0.1 mL de la alícuota de la suspensión celular a cada uno de cinco pocillos, placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron cien microlitros de medio CD -CHO (Gibco) que contenía 4 mM del suplemento GlutaMAX™-1 (Gibco™, Invitrogen Corporation) y sin suplementos de timidina e hipoxantina a los pocillos que contenían células (volumen final de 2 mL).

Se identificaron diez clones de las 5 placas desarrolladas sin metotrexate.

TABLA 10. Actividad hialuronidasa de los clones identificados

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

Se expandieron en cultivo seis clones de HZ24 y se transfirieron en frascos agitadores como suspensiones celulares individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9,1E11, y

4D10 fueron plaqueados en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos usando la estrategia de dilución infinita bidimensional en la cual las células fueron diluidas 1:2 en la parte de abajo de la placa, y 1:3 a través de la placa, comenzando en 5000 células en el pocillo a mano izquierda superior. Los clones diluidos fueron desarrollados en un respaldo de 500 células DG44 de CHO no transfectadas por pocillo, para proporcionar los factores de crecimiento necesarios para los días iniciales en cultivo. Diez placas fueron elaboradas para subclonar, con cinco placas que contenían 50 nM de metotrexate y 5 placas sin metotrexate.

El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales (13 del tratamiento sin metotrexate y 11 del tratamiento con 50 nM de metotrexate. Se midió la actividad hialuronidasa significativa en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (> 50 Unidades/ mL), y estos 8 subclones fueron expandidos en frascos de cultivo de tejido T-25. Los clones aislados a partir del protocolo con tratamiento con metotrexate fueron expandidos en la presencia de 50 nM de metotrexate. El clon 3D35M fue expandido adicionalmente en 500 nM de metotrexate dando origen a clones que produjeron en exceso de 1,000 Unidades/mL en frascos agitadores (el clon 3D35M; o 3D35M de gen1). Se preparó entonces un banco de células madres (MCB, siglas del inglés Master Cells Bank) de las células 3D35M.

522

Ejemplo 3

Determinación de la Actividad Hialuronidasa de rHuPH20 soluble

Se determinó la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble en muestras tales como cultivos celulares, fracciones de purificación y soluciones purificadas usando un ensayo turbidimétrico, el cual se basó en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se enlaza a albúmina de suero. La actividad es medida por incubación de rHuPH20 con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) por un período de tiempo ajustado (10 minutos) y precipitando luego el hialuronato de sodio sin digerir con la adición de albúmina de suero acidificada. La turbidez de la muestra resultante se midió a 640 nm después de un período de desarrollo de 30 minutos. La disminución de la turbidez resultante de la actividad enzimática sobre el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad hialuronidasa de rHuPH20 soluble. El método se efectuó usando una curva de calibración generada con diluciones de un ensayo con rHuPH20 soluble trabajando el estándar de referencia, y la muestra, se hicieron mediciones de actividad en relación a su curva de calibración.

Se prepararon diluciones de la muestra en Soluciones Diluyentes para Enzimas. La Solución Diluyente

para Enzimas se preparó disolviendo 33.0 ± 0.05 mg de gelatina hidrolizada en 25.0 mL del regulador de Reacción PIPES de 50 mM (140 mM de NaCl, 50 mM de PIPES, pH de 5.5) y 25 mL de SWFI, y diluyendo 0.2 mL de solución de Buminato al 25 % en la mezcla y aplicando vórtice por 30 segundos. Esto se efectuó en 2 horas de uso y se almacenó sobre hielo hasta que fue necesario. Las muestras fueron diluidas a un estimado de 1 - 2 U/mL. Generalmente, la dilución máxima por etapa no excedió de 1:100 y el tamaño de muestra inicial para la primera dilución no fue de menos de 20 µl- Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para efectuar los ensayos fueron: muestras en proceso, Fracciones de FPLC: 80 µL; Sobrenadantes de Cultivo de Tejido: 1 mL; material concentrado, 80 µL; Material de la Etapa Final o Purificado: 80 µL. Las diluciones se hicieron por triplicado en una placa de 96 pocillos para Enlace de Bajas Proteínas y 30 µL de cada dilución fueron transferidos a placas de fondo redondo Optilux Negros/Claros (BD BioSciences).

Se prepararon diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2.5 U/mL en Soluciones Diluyentes para Enzimas para generar una curva estándar y se añadieron a la placa de 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. Se incluyeron en la placa pocillos "Blanco Reactivo" que contuvieron 60 µL de Solución Diluyente para Enzimas como un control negativo. La placa fue entonces cubierta y calentada sobre un bloque de calor por 5 minutos a 37 °C. Se retiró la cubierta y la placa fue sacudida por 10 segundos. Después de sacudir, la placa fue retornada a la placa en el bloque de calor y el Dispositivo para Manejo de Líquidos MULTIDROP 384 fue cebado con la solución de 0.25 mg/mL de hialuronato de sodio templada (preparada disolviendo 100 mg de hialuronato de sodio (LifeCore Biomedical) en 20.0 mL de SWF1. Esta fue mezclada rotando suavemente y/o meciendo a 2 - 8 °C por 2 - 4 horas, o hasta disolución completa). La placa de reacción fue transferida al MULTIDROP 384 y la reacción fue iniciada presionando la tecla de inicio para distribuir 30 µL de hialuronato de sodio en cada pocillo. La placa fue entonces retirada del MULTIDROP 384 y sacudida por 10 segundos antes de ser transferida a un bloque de calor con la cubierta de la placa reubicada. La placa fue incubada a 37 °F por 10 minutos.

Se preparó el MULTIDROP 384 para detener la reacción cebando la máquina con solución de Trabajo con Suero y cambiando el ajuste de volumen a 240 µL, (25 µL de Solución

Madre con Suero [1 volumen de Suero de Caballo (Sigma) fue diluído con 9 volúmenes de Solución Reguladora de 500 mM de Acetato y se ajustó el pH a 3.1 con ácido clorhídrico] en 75 mL de Solución Reguladora de 500 mM de Acetato). La placa fue retirada del bloque de calor y colocada sobre el MULTIDROP 384 y se distribuyeron 240 µL de Solución de Trabajo de Suero en los pocillos. La placa fue retirada y sacudida sobre un lector de placas por 30 segundos. Después de 15 minutos adicionales, se midió la turbidez de las muestras a 640 nm y se determinó la actividad hialuronidasa (en U/mL) de cada muestra por ajuste a la curva estándar

Se calculó la actividad específica (Unidades/mg) dividiendo la actividad hialuronidasa (U/mL) entre la concentración de proteínas (mg/mL).

Ejemplo 4

Producción y Purificación de PH20 Humana de Gen1

A. Proceso en Bioreactor de 5 L

Un frasquito de 3D35 fue descongelado y expandido desde los frascos agitadores hasta frascos giratorios de 1 L en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) suplementado con 100 nM de Metotrexate y GlutaMAX™-1 (Invitrogen). Se transfirieron las células de los frascos rotatorios a un bioreactor de 5 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4 x 10^5 células viables por mL. Los parámetros fueron

regulación de Temperatura 37 °C, pH de 7.2 (Regulación de arranque), con Regulación de Oxígeno Disuelto de 25 % y una sobrecapa de aire de 0 -100 cc/min. A 168 horas, se añadieron 250 mL del Medio de Alimentación # 1 (CD-CHO con 50 g/L de Glucosa). A 216 horas, se añadieron 250 mL del Medio de Alimentación # 2 (CD CHO con 50 g/L de Glucosa y 10 mM de butirato de sodio), y a 264 horas se añadieron 250 mL del Medio de Alimentación # 2. Este proceso dio como resultado una productividad final de 1600 Unidades por mL con una densidad celular máxima de 6 x 10^6 células/mL. La adición de butirato de sodio fue para mejorar dramáticamente la producción de rHuPH20 en las etapas finales de producción.

El medio acondicionado del clon 3D35M fue clarificado por filtración profunda y diafiltración de flujo tangencial en 10 mM de HEPES a pH de 7.0. Se purificó luego la rHuPH20 soluble por cromatografía secuencial sobre intercambio iónico de Q Sepharose (Pharmacia), cromatografía de interacción hidrofóbica de Fenil Sepharose (Pharmacia), Cromatografía de Hidroxiapatita (Biorad, Richmond, CA). y con borato de fenilo (Prometics).

rHuPH20 soluble se enlazó a Q Sepharose y se eluyó a 400 mM de NaCl en el mismo regulador. El eluato fue diluído con sulfato de amonio 2M a una concentración final de 500 mM de sulfato de amonio y se pasó a través de una columna de

527

Fenil Sepharose (baja sub), seguido por enlace bajo las mismas condiciones a una resina de borato de fenilo. La rHuPH20 soluble fue eluida de la resina de fenil Separose en Hepes a pH de 6.9 después de lavar a pH de 9.0 en 50 mM de bicina sin sulfato de amonio. El eluato fue cargado sobre una resina de hidroxiapatita cerámica a pH de 6.9 en 5 mM de fosfato de potasio y 1 mM de $CaCl_2$ y eluyó con 80 mM de fosfato de potasio, pH de 7.4 con 0.1 mM de $CaCl_2$.

El rHuPH20 soluble purificado resultante poseyó una actividad específica en exceso de 65,000 Unidades USP/mg de proteína vía el ensayo de microturbidez (ejemplo 16) usando el estándar de referencia USP. Las PH20 purificadas eluyeron como un pico único desde 24 a 26 minutos a partir de una columna de estireno divinil benceno 5RPC de Pharmacia con un gradiente entre 0.1 % de TFA/H_2O y 0.1 %de TFA/ 90 % de acetonitrilo/10 % de agua y resolvió como una sola banda amplia de 61 kDa por electroforesis sobre SDS que se redujo a una banda aguzada de 51 kDa después de tratamiento con PNGASE-F. La formación de secuencias del aminoácido N-terminal reveló que el péptido líder había sido removido eficientemente.

B. Proceso de Expansión del Cultivo Celular en Dirección Opuesta de la Expresión Genética en Cultivo Celular del Bioreactor de 100 L

Se usó un proceso a mayor escala para purificar separadamente rHuPH20 soluble a partir de cuatro frasquitos diferentes de células 3D35M para producir cuatro lotes separados de sHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C. Cada frasquito fue expandido separadamente y cultivado mediante un bioreactor de 125 L, lego fue purificado usando cromatografía de columna. Se tomaron muestras en el transcurso del proceso para evaluar parámetros como el rendimiento enzimático. La descripción del proceso proporcionó las especificaciones representativas expuestas posteriormente para cosas tales como el arranque del bioreactor y volúmenes de medios de alimentación, densidades celulares de transferencia, y volúmenes de elución y lavado. Los números exactos varían ligeramente con cada lote, y se detallan en las Tablas 11 a 18.

Cuatro frasquitos que contenían células 3D35M fueron descongeladas en un baño de agua a 37 °C, se añadió medio CD CHO que contenía 100 nM de metotrexate y 40 mL/L de GlutaMAX y las células fueron centrifugadas. Las células fueron resuspendidas en un frasco con agitación de 125 mL con 20 mL de medio recientemente preparado y se colocaron en una incubadora a 37 °C, CO_2 al 7 %. Las células fueron expandidas hasta 40 mL en el frasco con agitación de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el

cultivo fue expandido en un frasco rotatorio de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. El frasco fue incubado a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco rotatorio de 250 mL en volumen de cultivo de 200 mL, y el frasco fue incubado a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco rotatorio de 1 L en volumen de cultivo de 800 mL y se incubó a 27 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco rotatorio de 6 L en volumen de cultivo de 5 L y se incubó a 27 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco rotatorio de 36 L en volumen de cultivo de 20 L y se incubó a 27 °C, CO_2 al 7 %.

Se esterilizó un reactor de 125 L con vapor a 121 °C, 1.4 kg/cm^2 (20 psi) y se añadieron 65 L de medio CD CHO. Antes de uso el reactor fue verificado para contaminación. Cuando la densidad celular en los frascos rotatorios de 36 L alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, 20 L del cultivo celular fueron transferidos desde los frascos giratorios de 36 L al bioreactor de 125 L (Braun), resultando un volumen final de 85 L y una densidad de siembra de aproximadamente 4 x 10^5

células/mL. Los parámetros fueron regulación de temperatura, 37 °C; pH: 7.2, Oxígeno Disuelto: 25 % ± 10 %, Velocidad del Impulsor: 50 rpm, Presión del Reactor: 0.21 kg/cm^2 (3 psi); Burbujeo de Aire: 1 l /min; Capa Superpuesta de Aire: 1 L/min. El reactor fue muestreado diariamente para conteo celular, verificación de pH, análisis del medio, retención y producción de proteínas. La alimentación de nutrientes fue añadida durante la corrida. Al día 6, se añadieron 3.4 L de Medio de Alimentación # 1 (CD CHO + 50 g/l de Glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX™-1) y la temperatura del cultivo se cambió a 36.5 °C. Al día 9, se añadieron 3.5 L de Medio de Alimentación # 2 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX™-1 + 1.1 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo se cambió a 36 °C. Al día 11, se añadieron 3.7 L de Medio de alimentación # 3 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 40 mL/L de GlutaMAX™-1 + 1.1 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo se cambió a 35.5 °C. El reactor fue cosechado a 14 días o cuando la viabilidad celular haya caído abajo de 50 %. El proceso dio como resultado la producción de rHuPH20 soluble con una actividad enzimática de 1600 Unidades/mL con una densidad celular máxima de 8 millones de células/mL. Al cosechar el cultivo fue muestreado para micoplasma, carga biológica, endotoxina, y virus in vitro e

in vivo, microscopía electrónica de transmisión (TEM, siglas del inglés Transmission Electron Microscopy) para partículas virales, y actividad enzimática.(

La cosecha del cultivo celular del bioreactor de 100 litros fue filtrada a través de una serie de filtros de cápsula desechables que tenían un medio de poliétersulfona (Sartorius): primero a través de una cápsula de 8.0 µm de profundidad, una cápsula de 0.65 µm de profundidad, una cápsula de 0.22 µm de profundidad, y finalmente a través de un filtro de 2000 cm^2 Sartopore de 0.22 µm y en una bolsa de almacenamiento estéril de 100 L. El cultivo fue concentrado 10 veces usando dos TFF con filtros MWCO de 30 kDa en Espiral de Poliéter sulfona (Millipore), seguido por un intercambio de regulador 6 veces con 10 mM de HEPES, 25 mM de Na_2SO_4, pH de 7.0 en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La Tabla 11 proporciona los datos relacionados con el cultivo celular, cosecha, concentración y etapas de intercambio de regulador.

Tabla 11. Datos de monitoreo para cultivo celular, cosecha, concentración y etapas de intercambio de regulador.

Parámetro	HUA0406C	HUA04010C	HUA0415C	HUA0420C
Tiempo de descongelación para inocular al bioreactor de 100 L (días)	21	19	17	18
Densidad de inoculación de 100 L (x 10^6 células/mL)	0.45	0.33	0.44	0.46
Tiempo de duplicación en crecimiento logarítmico (hr)	29.8	27.3	29.2	23.5
Densidad celular máxima (x 10^6 células/mL)	5.65	8.70	6.07	9.70
Viabilidad de la cosecha (%)	41	48	41	41
Título de la cosecha (U/mL)	1964	1670	991	1319
Tiempo en el bioreactor de 100 L (días)	13	13	12	13
Volumen de cosecha clarificado (mL)	81800	93300	91800	89100
Ensayo enzimático de la cosecha clarificada (U/mL)	2385	1768	1039	1425

Tabla 11 (Continuación)

Parámetro	HUA0406C	HUA04010C	HUA0415C	HUA0420C
Ensayo enzimático del concentrado (U/mL)	22954	17091	8561	17785
Ensayo enzimático del concentrado con regulador intercambiado (U/mL)	15829	11649	9915	8679
Ensayo enzimático del concentrado con regulador filtrado (U/mL)	21550	10882	9471	8527
Volumen de concentrado con regulador intercambiado (mL)	10699	13578	12727	20500
Proporción de concentración de unidades enzimáticas/cosecha	0.87	0.96	1.32	1.4

Se preparó una columna de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia) (3 L de resina, altura de 20 cm, diámetro = 14 cm. Se colectaron las muestras lavadas para una determinación de pH, conductividad y ensayo de endotoxinas (LAL). La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna

de 10 mM de Tris, 20 mM de Na_2SO_4, pH de 7.5. Se cargó la cosecha diafiltrada, concentrada sobre la columna Q a un gasto de 100 cm/ hr. La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna de 10 mM de Tris, 20 mM de Na_2SO_4, pH de 7.5 y 10 mM de Hepes, 50 mM de NaCl, pH de 7.0. La proteína fue eluída con 10 mM de Hepes, 400 mM de NaCl, pH de 7.0 y se filtró a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril. Después se efectuó cromatografía de interacción hidrofóbica sobre Fenil Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna Fenil Sepharose (PS) (9.1 L de resina, Altura = 29 cm, Diámetro = 20 cm). La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna de 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M, $CaCl_2$ 0.1 mM, pH de 7.0. El eluato de proteína de la columna anterior fue suplementado con sulfato de amonio 2M, fosfato de potasio 1M y solución madre de $CaCl_2$ 1M a la concentración final de 5 mM, 0.5 M y 0.1 M, respectivamente. La proteína fue cargada sobre la columna PS a un gasto de 100 cm/hr. 55 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M y 0.1 mM de $CaCl_2$, pH de 7.0 fueron añadidos a 100 cm/hr. El flujo que atravesó, fue pasado a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril.

La proteína purificada por PS fue cargada sobre una columna de borato de aminofenilo (ProMedics) (6.3 L de resina, Altura = 20 cm, Diámetro = 20 cm) que había sido

equilibrada con 5 volúmenes de columna de 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M. La proteína fue pasada a través de la columna a un gasto de 100 cm/hr, y la columna fue lavada con 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M,, pH de 7.0. La columna fué entonces lavada con 20 mM de bicina, 10 mM de NaCl, pH de 9.0 y la proteína eluyó con 50 mM de Hepes, 100 mM de NaCl, pH de 6. a través de un filtro estéril y en una bolsa estéril de 20 L. El eluato fue probado para carga biológica, concentración de proteína, y actividad enzimática.

Una columna de hidroxiapatita (HAP) (BioRad) (1.6 L de resina, Altura = 10 cm, Diámetro = 14 cm), se equilibró con 5 mM de fosfato de potasio, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de CaCl2, pH de 7.0. Se colectaron muestras lavadas y se probaron para pH, conductividad y endotoxinas (ensayo LAL). El La proteína purificada con borato de amino fenilo fue suplementada con fosfato de potasio y CaCl2 para producir concentraciones finales de 5 mM de fosfato de potasio y 0.1 mM de CaCl2 y se cargó sobre la columna de HAP a un gasto de 100 cm/hr. La columna fue lavada con 5 mM de fosfato de potasio a pH de 7.0, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de $CaCl_2$, luego 10 mM de fosfato de potasio pH de 7.0, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de $CaCl_2$, pH de 7.0. La proteína fue eluida con 70 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0 y se filtró a través de un

536

filtro de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 5 L. El eluato fue probado para carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

La proteína purificada con HAP fue entonces bombeada a través de un filtro de remoción viral de 20 nM vía un tanque a presión. La proteína fue añadida al tanque de presión DV20 y se filtró (Pall Corporation), pasando a través de un filtro Ultipor DV20 con poros de 20 nm (Pall Corporation) en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. El filtrado fue probado para concentración de proteína, actividad enzimática, oligosacáridos, monosacáridos y perfil de ácido siálico, e impurezas relacionadas con el proceso. La proteína en el filtrado fue entonces concentrada a 1 mg/mL usando un fin de filtrado de peso molecular de 10 kD (MWCO, Molecular Weight Cut Off) sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocon Slice (Sartorius). El filtro se preparó primero por lavado con una solución de Hepes/solución salina (10 nM de Hepes, 130 mM de NaCl, pH de 7.0) y el permeado fue muestreado para pH y conductividad. Después de concentración, la proteína concentrada fue muestreada y probada para concentración de proteína y actividad enzimática. Se efectuó un intercambio con 6 veces regulador sobre la proteína concentrada en el regulador final: 10 mM de Hepes, 130 mM de NaCl, pH de 7.0. La proteína concentrada fue

pasada a través de un filtro de 0.22 µm en una bolsa estéril de 20 L. La proteína fue muestreada para concentración de proteína, actividad enzimática, grupos sulfhidrilo libres, perfil de oligosacáridos y osmolaridad.

Las Tablas 12 a 18 proporcionan datos del monitoreo relacionados con cada una de las etapas descritas anteriormente, para cada lote de células 3D35M.

Tabla 12. Datos de la columna con Q Sepharose

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de carga (mL)	10647	13524	12852	20418
Proporción en volumen de carga/volumen de resina	3.1	4.9	4.5	7.3
Volumen de columna (mL)	2770	3840	2850	2880
Volumen de eluato (mL)	6108	5923	5759	6284
Concentración proteínica de eluato (mg/mL)	2.8	3.05	2.80	2.86
Ensayo enzimático de eluato (U/mL)	24493	26683	18321	21052
Rendimiento enzimático (%)	65	107	87	76

Tabla 13.Datos de la columna con Fenil Sepharose

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen antes de la adición de la solución madre (mL)	5670	5015	5694	6251
Volumen de carga (mL)	7599	6693	7631	8360
Volumen de columna (mL)	9106	9420	9340	9420
Proporción de volumen de carga/ volumen de resina	0.8	0.71	0.82	0.89
Volumen de eluato (mL)	16144	18010	16960	17328
Conc. de proteína del eluato (mg/mL)	0.4	0.33	0.33	0.38
Ensayo enzimático del eluato (U/mL)	8806	6585	4472	7509
Rendimiento de proteínas (%)	41	40	36	37
Rendimiento enzimático (%)	102	88	82	96

Tabla 14.Datos de la columna con Borato de amino fenilo

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de carga (mL)	16136	17958	16931	17884
Proporción de volumen de carga/volumen de resina	2.99	3.15	3.08	2.98
Volumen de columna (mL)	5400	5700	5500	5300
Volumen de eluato (mL)	17595	22084	20686	19145
Conc. de proteínas del eluato (mg/mL)	0.0	0.03	0.03	0.04
Conc. De proteínas del eluato filtrado mg/mL)	No probado	0.03	0.00	0.04
Ensayo enzimático del eluato (U/mL)	4050	2410	1523	4721
Rendimiento de proteínas (%)	0	11	11	12
Rendimiento enzimático (%)	N.D.	41	40	69

N.D. = No determinado

Tabla 15. Datos de la columna con Hidroxiapatita.

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen antes de adición de la solución madre (mL)	16345	20799	20640	19103
Proporción de volumen de carga/volumen de resina	10.95	13.58	14.19	12.81
Volumen de columna (mL)	1500	1540	1462	1500
Volumen de carga (mL)	16429	20917	20746	19213
Volumen de eluato (mL)	4100	2415	1936	2419
Concentración de proteínas del eluato (mg/mL)	No probada	0.24	0.17	0.23
Concentración de proteínas del eluato filtrado (mg/mL)	NA	NA	0.17	NA
Ensayo enzimático del eluato (U/mL)	14051	29089	20424	29826
Rendimiento de proteínas (%)	No probado	93	53	73
Rendimiento enzimático (%)	87	118	140	104

Tabla 16. Datos de filtración sobre DV20

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (mL)	4077	2233	1917	2419
Volumen de filtrado (mL)	4602	3334	2963	3504
Concentración de proteínas del filtrado (mg/mL)	0.1	NA	0.09	NA
Concentración de proteínas del eluato filtrado (mg/mL)	NA	0.15	0.09	0.16
Rendimiento de proteínas (%)	No probado	93	82	101

Tabla 17. Datos de concentración final.

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (mL)	4575	3298	2963	3492
Volumen del concentrado (mL)	562	407	237	316
Concentración de proteínas del concentrado (mg/mL)	0.9	1.24	1.16	1.73
Rendimiento de proteínas (%)	111	102	103	98

Tabla 18. Datos de Intercambio con Regulador en la Formulación Final

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen inicial (mL)	562	407	237	316
Concentrado Intercambiado con Regulador a volumen final (mL)	594	516	310	554
Concentración de proteínas del concentrado (mg/mL)	1.00	0.97	0.98	1.00
Concentración de proteínas del concentrado fitrado (mg/mL)	0.95	0.92	0.95	1.02
Rendimiento de proteínas (%)	118	99	110	101

La proteína rHuPH20 soluble concentrada y purificada fue llenada asépticamente en frasquitos estériles con volúmenes de llenado de 5 mL y 1 mL. La proteina fue pasada a través de un filtro de 0.22 µm a una bomba controlada por operador que se usó para llenar los frasquitos usando una terminación de llenado gravimétrica. Los frasquitos fueron cerrados con tapones y asegurados con un capuchón a presión. Los frasquitos cerrados fueron inspeccionados visualmente para partículas extrañas y luego fueron etiquetados. Después de etiquetar, los frasquitos fueron congelados instantáneamente por inmersión en nitrógeno

líquido por no más tiempo que 1 minuto y fueron almacenados a ≤ 15 °C (-20 ± 5 °C).

Ejemplo 5

Producción de Células Gen2 que Contienen PH20 Humana Soluble (rHuPH20)

La línea celular 3D35M de Gen1 descrita en el Ejemplo 2 fue adaptada para niveles más altos de metotrexate para producir clones de generación 2 (Gen2). Células 3D35M fueron sembradas a partir de cultivos que contenían metotrexate en medio de cultivo CD CHO que contenía 4 mM de GlutaMAX-1™ y 1.0 µM de metotrexate. Las células fueron adaptadas a un nivel de metotrexate más alto desarrollándolas y pasándolas 9 veces durante un período de 46 días en una incubadora a 37 °C, humidificada con CO_2 al 7 %. La población amplificada de células clonadas fueron separadas limitando la dilución en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contenían medio con 2.0 µM de metotrexate. Después de aproximadamente 4 semanas, se identificaron los clones y se seleccionó el clon 3E10B para expansión. Las células 3E10B fueron desarrolladas en medio CD CHO que contenía 4 mM de GlutaMAX-1™ y 2.0 µM de metotrexate por 20 traspasos de células. Se creó un banco de células madres (MCB, Master

Cells Bank) de la línea celular 3E10B y se congelaron y usaron para estudios subsecuentes.

La amplificación de la línea celular continuó por medio del cultivo de células 3E10B en medio CD CHO que contenía 4 mM de GlitaMAX-1™ y 4.0 μM de metotrexate. Después de la doceava vez que se traspasaron, las células fueron congeladas en frasquitos como un banco de células de investigación (RCB, Research Cells Bank). Un frasquito de RCB fue descongelado a temperatura ambiente y cultivado en medio que contenía 6.0 μM de metotrexate. Después de 5 días, la concentración de metotrexate en el medio fue decreciente a 16.0 μM, luego 20.0 μM 18 días después. Las células del octavo traspaso en medio que contenía 20.0 μM de metotrexate clonadas fueron separadas limitando la dilución en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contenía medio CD CHO que contenía 4 mM de GlutaMAX-1™ y 20.0 μM de metotrexate. Los clones fueron identificados 5-6 semanas después y se seleccionó el clon 2B2 para expansión en medio que contenía 20.0 μM de metotrexate. Después del primer traspaso, las células 2B2 fueron congeladas en frasquitos como un banco de células de investigación (RCB).

Las células 2B2 resultantes son células DG44 CHO deficientes en dihidrofoliato reductasa (dhfr-) que expresan

545

a PH20 recombinante humana soluble (rHuPH20). La PH20 soluble está presente en células 2B2 en un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. Análisis por tinción Southern del ADN de la célula 2B2 genómica digerida en SpeI-, Xba I- y BamH I/Hind III usando una sonda específica para rHuPH20 reveló el perfil de digestión de restricción siguiente: una banda hibridizante importante de ~ 7.7 kb y cuatro bandas hibridizantes menores (~ 13.9 ~ 6.6, ~ 5.7 y ~ 4.6 kb) con ADN digerido con Spe I; una banda hibridizante importante de ~ 5.0 kb y dos bandas hibridizantes menores (~ 13.9 y ~ 6.5 kb) con ADN digerido con Xba I; y una sola banda hibridizante de ~ 1.4 kb observada usando ADN de 2B2 digerido con BamH I/Hind III. El análisis de la secuencia del mARN transcrito indicó que la cADN derivada (SEC ID NO: 56) fue idéntica a la secuencia de referencia (SEC ID NO: 49) excepto por la diferencia de un par base en la posición 1131, la cual se observó que era timidina (T) en vez de la citosina (C) esperada. Esta es una mutación silenciosa, sin ningún efecto sobre la secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 6

A.Producción de rHuH20 soluble de Gen2 en el Cultivo Celular del Bioreactor de 300 L

Se descongeló a temperatura ambiente un frasquito de HZ24-2B2 y se expandió a partir de frascos con agitación a través de los frascos giratorios de 36 L en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 20 μM de metotrexate y GlutaMAX-1™ (Invitrogen). Resumiendo, Un frasquito de células fue descongelado en baño de agua a 37 °C, se añadió medio y las células fueron centrifugadas. Las células fueron resuspendidas en un frasco con agitación de 125 mL con 20 mL de medio recientemente preparado y se colocaron en incubadora a 37 °C, CO_2 al 7 %. Las células fueron expandidas hasta 40 mL en el frasco agitador de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzada fue mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco giratorio de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. El frasco fue incubado a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzada fue mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco giratorio de 250 mL en volumen de cultivo de 200 mL, y el frasco fue incubado a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzada fue mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco giratorio de 1 L en volumen de cultivo de 800 mL y se incubó a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzada fue mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue

expandido en un frasco giratorio de 6 L en volumen de cultivo de 5000 mL y se incubó a 37 °C, CO_2 al 7 %. Cuando la densidad celular alcanzada fue mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo fue expandido en un frasco giratorio de 36 L en volumen de cultivo de 32 L y se incubó a 37 °C, CO_2 al 7 %.

Se esterilizó un reactor de 400 L y se añadieron 230 mL de medio CD-CHO. Antes de uso, el rector fue verificado para contaminación. Se transfirieron aproximadamente 30 L de células del frasco giratorio de 36 L al bioreactor de 400 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4.0 x 10^5 células viables por mL y un volumen total de 260 L. Los parámetros fueron temperatura regulada a 37 °C; Velocidad del Impulsor, 40 - 55 RPM; Presión del Reactor: 0.21 kg/cm^2 (3 psi); Burbujeo de Aire: 0.5 - 1.5 L/Min; Capa Superpuesta de Aire: 3 L/min. El reactor fue muestreado diariamente para conteo celular, verificación de pH, análisis del medio, producción y retención de proteína. También, durante la corrida se añadió la alimentación de nutrientes. A 120 hrs (día 5), se añadieron 10.4 L de Medio de alimentación # 1 (4 x CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 160 mL/L de GlutaMAX-1™ + 83 mL/L de Levadurato + 33 mg/L de rHuInsulina). A 168 horas (día 7), se añadieron 10.8 L de Medio de alimentación # 2 (2 x CD - CHO + 33 g/L de Glucosa + 80 mL/L de Glutamax-1™ + 167 mL/L de Levadurato + 0.92 g/L de

Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo fue cambiada a 36.5 °C. A 216 horas (día 9), se añadieron 10.8 L de Medio de Alimentación # 3 (1 x CD-CHO + 50 g/L de Glucosa + 50 mL/L de GlutaMAX-1™ + 250 mL/L de Levadurato + 1.80 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo se cambió a 36 °C. A 264 horas (día 11), se añadieron 10.8 L de Medio de Alimentación # 4 (1 x CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 33 mL/L de GlutaMAX-1™ + 250 mL/L de Levadurato + 0.92 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo se cambió a 35.5 °C. Se observó que la adición de los medios de alimentación mejoró dramáticamente la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de producción. El reactor fue cosechado a 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células cayó abajo de 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. Al cosechar, el cultivo fue muestreado para micoplasma, carga biológica, endotoxinas y viral in vitro e in vivo, Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y actividad enzimática.

El cultivo fue bombeado por medio de una bomba peristáltica a través de un sistema de filtración de cuatro módulos Millistak (Millipore) en paralelo, que contenía cada uno una capa de tierras diatomáceas calibradas a 4 - 8 µm y

una capa de tierras diatomáceas calibradas a 1.4 - 1.1 µm, seguidas por una membrana de celulosa, luego a través de un segundo sistema de filtración Millistak individual (Millipore) que contenía una capa de tierras diatomáceas calibradas a 0.4 - 0.11 µm y una capa de tierras diatomáceas calibradas a < 0.1 µm, seguido por una membrana de celulosa, y luego a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa flexible estéril de un solo uso con una capacidad de 350 L. El fluido de cultivo celular cosechado fue suplementado con 10 mM de EDTA y 10 mM de Tris a un pH de 7.5. El cultivo fue concentrado 10 veces con un aparato para filtración de flujo tangencial (TFF, Tangencial Flow Filtration) que usa cuatro filtros de poliéter sulfona (PES, Polyether sulfone) de corte de peso molecular (MWCO) de 30 kDa Sartoslice TFF (Sartorius), seguido por un inrtercambio de regulador 10 veces con 10 mM de Tris, 20 mM de Na_2SO_4, pH de 7.5 en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 50 L.

La cosecha diafiltrada, concentrada fue inactivada para virus. Previo a la inactivación viral, se preparó una solución de Triton X-100 al 10 %, fosfato de tri(n-butilo) (TNBP, Tri-N-Butil) Phosphate) al 3 %. La cosecha diafiltrada, concentrada fue expuesta a Triton X-100 al 1 %,

TNBP al 0.3 % por 1 hora en un reactor de vidrio de 36 L inmediatamente antes de purificación sobre la columna Q.

B.Purificación de la Gen2 de rHuPH20 soluble

Se preparó la columna de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia) (9 L de resina, Altura = 29 cm, D = 20 cm). Se colectaron las muestras lavadas para una determinación de pH. Conductividad y ensayo para endotoxinas (LAL). La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna de 10 mM de Tris, 20 mM de Na_2SO_4, pH de 7.5. Después de inactivación viral, la cosecha diafiltrada, concentrada fue cargada sobre la columna Q a un gasto de 100 cm/hr. La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna de 10 mM de Tris, 20 mM de Na_2SO_4, pH de 7.5 y 10 mM de Hepes, 50 mM de NaCl, pH de 7.0. La proteína fue eluída con 10 mM de Hepes, 400 mM de NaCl, pH de 7.0 en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril. La muestra de eluato fue probada para carga biológica, concentración de proteína y actividad hialuronidasa. Se tomaron lecturas de absorbancia A_{280} al principio al final del intercambio.

Se efectuó después la cromatografía hidrofóbica sobre Fenil Sepharose (Pharmacia). Se preparó una columna de Fenil-Sepharose (PS) (19 a 21 L de resina, Altura = 29 cm, D = 30 cm). El lavado fue colectado y muestreado para pH, conductividad y endotoxinas (ensayo LAL). La columna fue

equilibrada con 5 volúmenes de columna de 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M, 0.1 mM de $CaCl_2$, pH de 7.0. El eluato de proteína de la columna Q Sepharose fue suplementado con soluciones madres de sulfato de amonio 2M, fosfato de potasio 1 M y $CaCl_2$ 1 M para producir concentraciones finales de 5 mM, 0.5 M y 0.1 mM, respectivamente. La proteína fue cargada sobre la columna de PS a un gasto de 100 cm/hr y se colectó el flujo que atravesó la columna. La columna fue lavada con 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M y 0.1 mM de $CaCl_2$, pH de 7.0 a 100 cm/hr y los lavados fueron añadidos al flujo que atravesó la columna colectado. Combinado con el lavado de la columna, el filtrado se pasó a través de un filtro final de 0.22 μm en una bolsa estéril. El filtrado fue muestreado para carga biológica, concentración de proteínas y actividad enzimática.

Se preparó una columna de borato de aminofenilo (Promtics). El lavado fue colectado y muestreado para pH, conductividad y endotoxinas (ensayo LAL). La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna de 5 mM de fosfato de potasio, sulfato de amonio 0.5 M. El flujo que atravesó la columna de PS que contenía la proteína purificada fue cargado sobre la columna de borato de aminofenilo a un gasto de 100 cm/hr. La columna fue lavada con 5 mM de fosfato de

potasio, sulfato de amonio 0.5 M, pH de 7.0. La columna fue lavada con 20 mM de bicina, sulfato de amonio 0.5 M, pH de 9.0. La columna fue lavada con 20 mM de bicina, 100 mM de cloruro de sodio, pH de 9.0. La proteína fue eluida con 50 mM de Hepes, 100 mM de NaCl, pH de 6.9 y se pasó a través de un filtro estéril a una bolsa estéril. La muestra eluida fue probada para carga biológica, concentración de proteína y actividad enzimática.

Se preparó la columna de hidroxiapatita (HAP) (Biorad). Se colectó el lavado y se probó para pH, conductividad y endotoxinas (ensayo LAL). La columna fue equilibrada con 5 mM de fosfato de potasio, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de $CaCl_2$, pH de 7.0. La proteína purificada con el borato de aminofenilo fue suplementada a concentraciones finales de 5 mM de fosfato de potasio y 0.1 mM de CaCl2 y fue cargada sobre la columna de HAP a un gasto de 100 cm/hr. La columna fue lavada con 5 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de CaCl2. La columna fue después lavada con 10 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0, 100 mM de NaCl, 0.1 mM de $CaCl_2$. La proteína fue eluida con 70 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0 y fue pasada a través de un filtro estéril de 0.22 µm a una bolsa estéril. La muestra eluida fue probada para carga biológica, concentración de proteínas y actividad enzimática.

La proteína purificada sobre HAP fue luego pasada a través de un filtro para remoción viral. El filtro Virosart (Sartorius) esterilizado fue preparado primero por lavado con 2 L de 70 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0. antes de uso, el regulador filtrado fue muestreado para pH y conductividad. La proteína purificada por HAP fue bombeada vía una bomba peristáltica a través de un filtro para remoción viral de 20 nM. La proteína filtrada en 70 mM de fosfato de potasio, pH de 7.0 fue pasada a través de un filtro final de 0.22 µm a una bolsa estéril. La muestra filtrada para remoción viral fue probada para concentración de proteínas, actividad enzimática, oligosacáridos, monosacáridos y perfil de ácido siálico. La muestra fue también probada para impurezas relacionadas con el proceso.

La proteína en el filtrado fue entonces concentrada a 10 mg/mL usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD Sartocon Slice (Sartorius). El filtro fue preparado primero por lavado con 10 mM de histidina, 130 mM de NaCl, pH de 6.0 y el permeado fue muestreado para pH y conductividad. Después de la concentración, la proteína concentrada fue muestreada y probada para concentración de proteínas y actividad enzimática. Se efectuó 6 veces un intercambio con regulador sobre la proteína concentrada en un regulador final: 10 mM de

histidina, 130 mM de NaCl, pH de 6.0.

Después del intercambio con regulador, la proteína concentrada fue pasada a través de un filtro de 0.22 µm a una bolsa estéril de 20 L. La proteína fue muestreada y probada para concentración de proteínas, actividad enzimática, grupos sulfhidrilo libres, perfil de oligosacáridos y osmolaridad.

La proteína bruta filtrada estéril fue entonces distribuida asépticamente a 20 mL en frasquitos de Teflón (Nalgene) estériles de 30 mL. Los frasquitos fueron entonces congelados instantáneamente y almacenados a -20 ± 5 °C.

C.Comparación de la Producción y Purificación de las Generaciones 1 y 2 de rHuPH20 soluble

La produccion y purificación de rHuPH20 soluble de Gen2 en un cultivo celular en un bioreactor de 300 L contuvo algunos cambios en los protocolos en comparación con la producción y purificación de rHuPH20 soluble de Gen1 en un cultivo celular en un bioreactor de 100 L)descrito en el Ejemplo 4.B). La Tabla 19 expone diferencias ejemplares, además de cambios a aumento de escala simple, entre los métodos.

Tabla 19		
Diferencia de proceso	Generación 1 de rHuPH20 soluble	Generación 2 de rHuPH20 soluble
Línea celular	3D35M	2B2
Medios usados para expandir el inóculo celular	Contiene 0.10 µM de metotrexate (0.045 mg/L)	Contiene 20 µM de metotrexate (9 mg/L)
Medios en 6 L de cultivos hacia adelante	Contiene 0.10 µM de metotrexate	No contiene metotrexate
Frasco giratorio de 36 L	Ninguna instrumentación Volumen de operación: 20 L	Equipado con instrumentación que monitorea y controla pH, oxígeno disuelto, burbujeo y gasto de gas de la capa superpuesta.
Volumen de operación final en el bioreactor	Aprox. 100 L en un bioreactor de 125 L (volumen de cultivo inicial + 65 L)	Aprox. 300 L en un bioreactor de 400 L (volumen de cultivo inicial + 260 L)
Medios de cultivo en el bioreactor final	No rHuInsulina	5.0 mg/L de rHuInsulina
Volumen de alimentación de los medios	Escalonado a 4 % del volumen del cultivo celular del bioreactor	Escalonado a 4 % del volumen del cultivo celular del bioreactor,

Tabla 19 (Continuación)

Diferencia de proceso	Generación 1 de rHuPH20 soluble	Generación 2 de rHuPH20 soluble
	es decir, 3.4, 3.5, 3.7 L, que dio como resultado un volumen de bioreactor objetivo de ~ 92 L.	es decir, 10.4, 10.8, 11.2 y 11.7 L que dio como resultado un volumen de bioreactor objetivo de ~ 303 L.
Alimentación de Medios	Medio de Alimentación # 1:CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 8 mM de GlutaMAX™-1. Alimentación # 2 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 8 mM de GlutaMAX + 1.1 g/L de Butirato de sodio. Alimentación # 3: CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 8 mM de GlutaMax + 1.1 g/L de butirato de sodio	Medio de Alimentación # 1: 4 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + 32 mM de Glutamax + 16.6 g/L de levadurato + 33 mg/L de rHuInsulina Alimentación # 2:2 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + 16 mM de Glutamax + 33.4 g/L de levadurato + 0.92 g/L de butirato de sodio. Alimentación # 3: 1 x CDCHO + 50 g/L de Glucosa + 10 mM de Glutamax + 50 g/L de levadurato + 1.80 g/L de butirato de sodio.

557

Tabla 19 (Continuación)

Diferencia de proceso	Generación 1 de rHuPH20 soluble	Generación 2 de rHuPH20 soluble
		Alimentación # 4: 1 x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + 6.6 mM de Glutamax + 50 g/L de Levadurato * 0.92 g/L de Butirato de Sodio.
Filtración del cultivo celular del Bioreactor	Cuatro filtros de poliétersulfona (8.0 µm, 0.65 µm y 0.22 µm) en serie	1ª. Etapa - Cuatro módulos en paralelo, cada uno con una capa de tierras diatomáceas calibrada a 4 - 8 µm y una capa de tierras diatomáceas calibradas a 1.4 - 1.1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 2ª. Etapa- módulo individual que contiene una capa de tierras diatomáceas calibradas a 0.4 - 0.11 µm y una capa de tierras diatomáceas calibradas a < 0.1 µm,

Tabla 19 (Continuación)

Diferencia de proceso	Generación 1 de rHuPH20 soluble	Generación 2 de rHuPH20 soluble
	Bolsa de almacenamiento de 100 L	Seguido por una membrana de celulosa. 3ª. Etapa: filtro de poliéter sulfona de 0.22 µm. Bolsa de Almacenamiento de 300 L. El cultivo celular cosechado es suplementado con 10 mM de EDTA, 10 mM de Tris a un pH de 7.5.
Concentración e intercambio de regulador antes de cromatografía	Concentrado con 2 con Filtros TFF con MWCO a 30 K de Poliétersulfona Millipore Spiral El concentrado intercambia de regulador 6 veces con 10 mM de Hepes, 25 mM de NaCl, pH de 7.0. Bolsa de almacenamiento estéril de 20 L.	Concentrado que usa cuatro Filtros TFF con MWCO a 30 K de Poliétersulfona Millipore Spiral El concentrado intercambia regulador 10 veces con 10 mM de Tris, 20 mM de Na2SO4, pH de 7.5. Bolsa de almacenamiento estéril de 50 L

Tabla 19 (Continuación)		
Diferencia de proceso	Generación 1 de rHuPH20 soluble	Generación 2 de rHuPH20 soluble
Inactivación viral antes de cromatografía	Ninguna	Inactivación viral efectuada con la adición de Triton X-100 al 1 %, Fosfato de tributilo al 0.3 %, pH de 7.5
Primera Etapa de purificación (Q Sepharose	Ninguna lectura de absorbancia	Mediciones de A_{280} al principio y al final
Filtración viral después de cromatografía	Filtro Pall DV-20 (20 nm)	Filtro Sartorius Virosart (20 nm)
Concentración e intercambio de regulador después de cromatografía	Regulador con Hepes/solución salina, pH de 7.0 Proteína concentrada a 1 mg/mL.	Regulador con Histidina/solución salina, pH de 6.0 Proteína concentrada a 10 mg/ml

Puesto que las modificaciones serán obvias para los expertos en el arte, está previsto que esta invención se limite solamente al alcance de las reivindicaciones anexas.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

1.- Una combinación de composiciones caracterizada porque comprende:

una primera composición que comprende IG formulada para administración en una sola dosificación subcutánea en una cantidad para tratamiento de una enfermedad tratable con IG no más de una vez por mes, en donde la cantidad de IG en la composición es sustancialmente la misma que la cantidad cuando se administra intravenosamente no más de una vez por mes para la misma enfermedad tratable con IG; y

una segunda composición que comprende una hialuronidasa soluble formulada para administración en una sola dosificación en combinación con la IG para el tratamiento no más de una vez por mes.

2.- La combinación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque las composiciones están en un contenedor con cámara dual o en un solo contendor

separadas entre sí.

3.- La combinación de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la hialuronidasa es posicionada en el contenedor para ser administrada antes de la IG.

4.- La combinación de conformidad con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, caracterizada porque el contenedor es una jeringa, tubo o botella.

5.- La combinación de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque el contendor comprende adicionalmente una aguja para inyección.

6.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, caracterizada porque la hialuronidasa soluble es una PH20, o una forma truncada de ésta.

7.- La combinación de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque la PH20 es seleccionada de una PH20 ovina, bovina o humana truncada.

8.- La combinación de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque la PH20 humana truncada es seleccionada de entre polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuestos en cualquiera de las SECS. ID. NOS: 4 - 9, o variantes alélicas u otras variantes de éstas.

9.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, caracterizada porque la hialuronidasa soluble es designada rHuPH20.

10.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, caracterizada porque la IG es purificada a partir de plasma humano.

11.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, caracterizada porque la IG es liofilizada o es proporcionada en una forma líquida.

12.- La combinación de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque el volumen de líquido es o es aproximadamente 100 mL, 150 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, o 700 mL.

13.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12, caracterizada porque la IG tiene una concentración proteínica que es menor que 16 % en peso/volumen de IG.

14.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12, caracterizada porque la IG tiene una concentración proteínica que es o es aproximadamente de 5 a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de la composición de IG.

15.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14, caracterizada porque la

concentración de proteína es de 10 % en peso/volumen.

16.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 15, caracterizada porque la IG en la composición es o es de aproximadamente 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g, o 40 g.

17.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14, caracterizada porque:

la IG en la primera composición es 27 g a 67 g o 25.5 g a 61.2 g; y

la hialuronidasa soluble en la segunda composición está en una cantidad que está en una proporción (unidades de hialuronidasa/gramos de IG) de 50 U/g.

18.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 17, caracterizada porque la hialuronidasa es proporcionada en un líquido.

19.- La combinación de conformidad con la reivindicación 18, caracterizada porque el volumen de líquido es o es aproximadamente 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 20 mL o 30 mL.

20.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 19, caracterizada porque la hialuronidasa es de o aproximadamente de 10 Unidades a

500,000 Unidades, 100 Unidades a 100,000 Unidades, 500 Unidades a 50,000 Unidades, 1,000 Unidades a 10,000 Unidades, 5,000 Unidades a 7,500 Unidades, 5,000 Unidades a 50,000 Unidades o 1,000 Unidades a 10,000 Unidades.

21.- Una combinación de composiciones, caracterizada porque comprende:

una primera composición que comprende IG formulada para administración subcutánea en una concentración de proteína de la IG en la composición, que sea menor que 16 % en peso/volumen de IG; y

una segunda composición que comprende una hilauronidasa soluble formulada en combinación con la IG en una cantidad suficiente para volver la composición de IG terapéuticamente efectiva.

22.- La combinación de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque las composiciones son formuladas para administración en dosificación única o para administración en dosificación múltiple.

23.- La combinación de conformidad con la reivindicación 21 o la reivindicación 22, caracterizada porque la cantidad de IG en la composición es sustancialmente la misma que la cantidad en una administración de dosificación única cuando se administra intravenosamente para tratamiento de una enfermedad o condición tratable con IG.

24.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-23, caracterizada porque la primera composición y la segunda composición son formuladas en una cantidad para administración diaria, semanal o bisemanalmente, cada 2-3 semanas, cada 3-4 semanas o mensualmente.

25.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-24, caracterizada porque la cantidad de IG en la primera composición es o es aproximadamente 1 gramo (g), 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g o 200 g.

26.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21 - 25, caracterizada porque la cantidad de hialuronidasa en la composición es o es aproximadamente 500 Unidades, 1,000 Unidades, 2,000 Unidades, 5,000 Unidades, 10,000 Unidades, 30,000 Unidades, 40,000 Unidades, 50,000 Unidades, 60,000 Unidades, 70,000 Unidades, 80,000 Unidades, 90,000 Unidades, 100,000 Unidades o más

27.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21 - 26, caracterizada porque la cantidad de hialuronidasa en la composición es una cantidad que está en una proporción (unidades de hialuronidasa/gramo de IG) que es o es aproximadamente 10 U/g, 20 U/g, 30 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150

U/g, 200 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g o más.

28.- La combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21 - 24, caracterizada porque:

la concentración de IG en la primera composición es 100 mg/mL; y

la concentración de hialuronidasa soluble en la segunda composición es 150 U/mL a 1,500 U/mL.

29.- Un equipo, caracterizado porque comprende la combinación de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 28, y opcionalmente instrucciones para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición tratable con IG.

30.- Un método para tratar una enfermedad o condición tratable con IG en un sujeto, caracterizado porque comprende:

primero, administrar subcutáneamente al sujeto una hialuronidasa soluble; y

después de administración de la hialuronidasa soluble, administrar una inmunoglobulina (IG) para tratar la enfermedad o condición, en donde la administración de la IG es efectuada de modo que la cantidad administrada y la frecuencia de administración sea sustancialmente la misma que para administración IV (intravenosa) de la misma cantidad vía IV para la misma enfermedad o condición.

31.- El método de conformidad con la reivindicación

30, caracterizado porque la cantidad de hialuronidasa soluble administrada es suficiente para efectuar biodisponibilidad de la IG administrada subcutáneamente de al menos aproximadamente 90 % de la biodisponibilidad de la misma dosificación administrada vía administración IV.

32.- El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque la cantidad de hialuronidasa soluble es suficiente para convertir a la IG administrada, terapéuticamente efectiva.

33.- El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque la cantidad de hialuronidasa soluble es suficiente para efectuar la administración subcutánea de la IG a una dosificación administrada no más de una vez al mes.

34.- El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque la frecuencia del régimen de dosificación comprende no más de una vez mensualmente la administración de IG.

35.- El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque la frecuencia del régimen de dosificación es diariamente, semanalmente, bisemanalmente, cada 2 - 3 semanas, cada 3 - 4 semanas o mensualmente.

36.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 35, caracterizado porque la

hialuronidasa soluble es una PH20, o una forma truncada de ésta.

37.- El método de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado porque la PH20 es seleccionada de una PH20 ovina, bovina o humana truncada.

38.- El método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque la PH20 humana truncada es seleccionada de entre polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID NOS.: 4 - 9 o variantes alélicas u otras variantes de éstas.

39.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 38, caracterizado porque la hialuronidasa soluble es rHuPH20.

40.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 39, caracterizado porque la IG es purificada a partir de plasma humano.

41.- El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque la IG purificada a partir de plasma humano es purificada por fraccionamiento alcohólico.

42.- El método de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque la IG es purificada adicionalmente por medio de una cualquiera o más de una modificación química, incubación a pH de 4.0 con o sin pepsina, precipitación con polietilenglicol (PEG), cromatografía por

intercambio iónico, fraccionamiento enzimático, tratamiento con detergente-solvente, diafiltración o ultrafiltración.

43.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 42, caracterizado porque la IG contiene IgG, IgA e IgM.

44.- El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque la IG contiene más de 95 % de IgG.

45.- El método de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque la IgG es monomérica.

46.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 45, caracterizado porque la IG contiene adicionalmente excipientes estabilizantes de proteínas.

47.- El método de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado porque el excipiente estabilizante de proteínas es seleccionado de entre uno o más de glicina, maltosa, un poliol, albúmina de suero humano, manitol, y detergente no iónico.

48.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 47, caracterizado porque el pH de la preparación de IG es de o aproximadamente 4.2 a 5.4, 4.6 a 5.1, o 4.8 a 5.0.

49.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 48, caracterizado porque la IG tiene una concentración de proteína que es o es aproximadamente 5

a 15 % en peso/volumen, 6 a 15 % en peso/volumen, u 8 a 12 % en peso/volumen de la composición de IG.

50.- El método de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado porque la concentración de proteína es de 10 % en peso/volumen.

51.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 50, caracterizado porque la IG es infusionada a una velocidad de 10 mL/hr a 300 mL/hr.

52.- El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque la velocidad es seleccionada de entre o aproximadamente 10 mL/hr, 20 mL/hr, 30 mL/hr, 40 mL/hr, 50 mL/hr, 60 mL/hr, 70 mL/hr, 80 mL/hr, 90 mL/hr, 100 mL/hr, 150 mL/hr, 200 mL/hr, 250 mL/hr y 300 mL/hr.

53.- El método de conformidad con la reivindicación 51 o la reivindicación 52, caracterizado porque la velocidad es controlada por medio de una bomba.

54.- El método de conformidad con la reivindicación 51 o la reivindicación 52, caracterizado porque la velocidad es controlada por gravedad.

55.- El método de conformidad con las reivindicaciones 30 - 54, caracterizado porque la hialuronidasa es administrada 0.5 minutos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 20 minutos o 30

571

minutos antes de administración de la IG.

56.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 55, caracterizado porque son administrados aproximadamente o 5 gramos (g), 10 g, 15 g, 20 g, 21 g, 22 g, 23 g, 24 g, 25 g, 26 g, 27 g, 28 g, 29 g, 30 g, 31 g, 32 g, 33 g, 34 g, 35 g, 36 g, 37 g, 38 g, 39 g, 40 g de IG.

57.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 56, caracterizado porque la hialuronidasa es administrada en una proporción (unidades de hialuronidasa/gramos de IG) de o aproximadamente 10 U/gramo (g), 20 U/g, 30 U/g, 35 U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g o 300 U/g.

58.-El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque la hialuronidasa es administrada en una proporción de o aproximadamente 50 U/gramo de IG.

59.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 57, caracterizado porque la IG es administrada a 50 mg/kg de peso corporal (PC), 100 mg/kg de PC, 200 mg/kg de PC, 300 mg/kg de PC, 400 mg/kg de PC, 500 mg/kg de PC o 600 mg/kg de PC.

60.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 57, caracterizado porque la IG es administrada a 600 mg/kg de PC y la hialuronidasa soluble es

administrada en una proporción (Unidades de hialuronidasa/gramo de IG) de 50 U/g.

61.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 - 60 caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es seleccionada de entre inmunodeficiencia; hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); Síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada ANCA positiva; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células embrionarias hemopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatías para-proteinémicas de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia de mioclonus opsoclonus; pénfigus foliáceo; pénfigus vulgaris; púrpura post-transfusión;

necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

62.- El método de conformidad con la reivindicación 61, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una inmunodeficiencia y la inmunodeficiencia es seleccionada de entre inmunodeficiencia variable común (CVID), agamaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), hipogamaglobulinemia primaria, enfermedades por inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agamaglobulinemia congénita o ligada al cromosoma X (XLA), hipogamaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebelar paraneoplástica sin anticuerpos.

63.- El método de conformidad con la reivindicación 61, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas, y la malignidad hematológica es seleccionada de entre leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), o linfoma diferente al de Hodgkin (NHL).

64.-El método de conformidad con la reivindicación

61, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una miopatía inflamatoria y la miopatía inflamatoria es seleccionada de entre polimiositis, dermatomiositis o miositis corporal por inclusión.

65.- El método de conformidad con la reivindicación 61, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una condición bacteriana, viral o fúngica y la condición bacteriana, viral o fúngica es seleccionada de entre Haemophilus influenzae de typo B, Pseudomonas aeruginosa de tipos A y B, Staphylococcus aureus, Streptococcus del Grupo B, Streptococcus penumoniae de los tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23, Adenovirus de los tipos 2 y 5, Citomegalovirus, virus VCA de Epstein Barr, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, Influenza A, sarampión, parainfluenza de tipos 1, 2 y 3, polio, virus de varicela zóster, Aspergillus y Candida albicans.

66.- Uso de una combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 28 para la formulación de un medicamento para tratar una enfermedad o condición tratable con IG, en un sujeto.

67.- El uso de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es seleccionada de entre inmunodeficiencia;

hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); Síndrome de Guillain-Barre; púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-Woltmann; hipogamaglobulinemia secundaria (incluyendo inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpos específicos; encefalomielitis diseminada aguda; vasculitis necrosizante generalizada ANCA positiva; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bullosa; penfigoide cicatrizante; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia feto-maternal/neonatal aloinmune (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células embrionarias hemopoyéticas alogénicas de alto riesgo; neuropatías para-proteinémicas de IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia de mioclonus opsoclonus; pénfigus foliáceo; pénfigus vulgaris; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de choque tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso generalizado; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; traumatismo; y una infección bacteriana, viral o fúngica.

68.- El uso de conformidad con la reivindicación 67, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una inmunodeficiencia y la inmunodeficiencia es seleccionada de entre inmunodeficiencia variable común (CVID), agamaglobulinemia congénita, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), hipogamaglobulinemia primaria, enfermedades por inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agamaglobulinemia congénita o ligada al cromosoma X (XLA), hipogamaglobulinemia de la infancia, y degeneración cerebelar paraneoplástica sin anticuerpos.

69.- El uso de conformidad con la reivindicación 67, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es hipogamaglobulinemia secundaria adquirida en malignidades hematológicas, y la malignidad hematológica es seleccionada de entre leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), y linfoma diferente al de Hodgkin (NHL).

70.- El uso de conformidad con la reivindicación 67, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una miopatía inflamatoria y la miopatía inflamatoria es seleccionada de entre polimiositis, dermatomiositis o miositis corporal por inclusión.

71.- El uso de conformidad con la reivindicación

67, caracterizado porque la enfermedad o condición tratable con IG es una condición bacteriana, viral o fúngica y la condición bacteriana, viral o fúngica es seleccionada de entre Haemophilus influenzae de typo B, Pseudomonas aeruginosa de tipos A y B, Staphylococcus aureus, Streptococcus del Grupo B, Streptococcus penumoniae de los tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23, Adenovirus de los tipos 2 y 5, Citomegalovirus, virus VCA de Epstein Barr, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, Influenza A, sarampión, parainfluenza de tipos 1, 2 y 3, polio, virus de varicela zóster, Aspergillus y Candida albicans.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan combinaciones, composiciones y equipos que contienen una composición de inmunoglobulina (IG) y una composición de hialuronidasa soluble formulada para administración subcutánea. Dichos productos pueden ser usados en métodos de tratar enfermedades o condiciones tratables con IG. También se proporcionan métodos para administración subcutánea de inmunoglobulina, con los cuales el régimen de dosificación es sustancialmente el mismo que para administración intravenosa de la misma dosificación para tratamiento de la misma enfermedad o condición tratable con IG.

PCT/US2009/001670

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No. PCT/US 09/01670

16 MAR 2009 (16.03.09)

International Filing Date

PCT INTERNATIONAL APPLICATION RO/US

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference *(if desired) (12 characters maximum)* 0119374-095 (3058PC)

Box No. I TITLE OF INVENTION

COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

BAXTER HEALTHCARE, S.A.
Hertistrasse 2
CH-8306 Wallisellen Kanton, Zurich
Switzerland

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: CH

State *(that is, country)* of residence: CH

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

BAXTER INTERNATIONAL, INC.
One Baxter Parkway
Deerfield, Illinois 60015
United States of America

This person is:
☒ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

SEIDMAN, Stephanie L.
K&L GATES LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130
United States of America

Telephone No. (858) 509-7400

Facsimile No. (858) 509-7460

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office 33,779

☐ **Address for correspondence:** Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

580

Sheet No. 2

Continuation of Box No. III **FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

HALOZYME, INC.
11388 Sorrento Valley Road
San Diego, California 92121
United States of America

This person is:
☒ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

SCHIFF, Richard
12916 Sunny Lane
Santa Rosa Valley, California 93012
United States of America

RO/US
EX OFFICIO

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

LEIBL, Heinz
Kininger Gasse 12, A-1120
Vienna
Austria

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: AT

State *(that is, country)* of residence: AT

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

FROST, Gregory I.
13662 Mercado Drive
Del Mar, California 92014
United States of America

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

581

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No ..." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:*

(i) ***if more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors*** *and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in thisBox is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;*

(ii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication* ***"the States indicated in the Supplemental Box"*** *is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;*

(iii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III,* ***the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America:*** *in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;*

(iv) *if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are* ***further agents:*** *in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;*

(v) *if, in Box No. VI, there are* ***more than three earlier applications whose priority is claimed:*** *in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.*

2. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication* ***"patent of addition" or "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition,"*** *the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other patent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis.1(a) or (b)).*

3. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis.1(d)).*

Continuation of Box No. IV

Attorney Names	U.S. Registration Nos.
MISKIEL, Frank J.	53,332
POTTER, Karen G.	57,254

582

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request **constitutes under Rule 4.9(a), the designation** of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

☐ DE Germany **is not designated** for any kind of national protection

☐ JP Japan **is not designated** for any kind of national protection

☐ KR Republic of Korea **is not designated** for any kind of national protection

☐ RU Russian Federation **is not designated** for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned if, at the time of filing or subsequently under Rule 26bis.1, the international application contains in Box No. VI a priority claim to an earlier national application filed in the particular State concerned, in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of this earlier national application.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO:	national application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 17 March 2008 (17.03.08)	61/069,841	US		
item (2) .				
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Transmit certified copy: the receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

☒ all items ☒ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

Restore the right of priority: the receiving Office is requested to restore the right of priority for the earlier application(s) identified above or in the Supplemental Box as item(s) (_____). *(See also the Notes to Box No. VI; further information must be provided to support a request to restore the right of priority.)*:

Incorporation by reference: where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for t he purposes of Rule 20.6

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):*

ISA/ EPO.....

Request to use result of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):*

Date *(day/month/year)* Number Country *(or regional Office)*

Box No. VIII DECLARATIONS

The following **declarations** are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):*			Number of declarations
☐	Box No. VIII (i)	Declarations as to the identity of the inventor :	
☒	Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent :	1
☒	Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application :	1
☐	Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) :	
☐	Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty :	

583

Box No. IX CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING

This international application **contains:**

(a) **in paper form,** the following number of sheets:

request (including declaration and supplemental sheets)	:	7
description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	:	104
claims	:	14
abstract	:	1
drawings	:	0
Sub-total number of sheets	:	126
sequence listings	:	68
tables related thereto *(for both, actual member of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)*	:	
Total number of sheets		194

(b) ☐ **only in electronic form** (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listings
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☒ **also in eletronic form** (Section 801(a)(ii))
- (i) ☒ sequence listings
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the:
- ☒ Sequence listings: .....
- ☐ tables related thereto: .....

(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)

This international application is **accompanied** by the following item(s) (*mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):*

		Number of items
1. ☒	fee calculation sheet	:1
2. ☒	original separate power of attorney	2
3. ☐	original general power of attorney	:
4. ☐	copy of general power of attorney; reference number, if any:	:
5. ☐	statement explaining lack of signature	:
6. ☐	priority document(s) identified in Box No. VI as item(s)	:
7. ☐	translation of international application into *(language):*	:
8. ☐	separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:
9. ☒	sequence listings in electronic form *(indicate type and number of carriers)*	:
(i) ☐	copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application):	:
(ii) ☒	*(only where check box (b)(i)or (c) (i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter*	:1
(iii) ☒	together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column	:1
10. ☐	tables in electronic form related to sequence listings *(indicate type and number of carriers)*	:
(i) ☐	copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-*quater)* only (and not as part of the international application)	:
(ii) ☐	*(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802 (b-*quater)*	:
(iii) ☐	together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:
11. ☒	other *(specify) Express Mail Letter; Return Receipt Postcard*.....	:2

Figure of the drawings which should accompany the abstract: N/A

Language of filing of the international application: ENGLISH

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request)

Stephanie L. Seidman, Esq., Reg. No. 33,779 16-03-2009
Attorney for Applicant(s)

For receiving Office only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	IAP19 Rec'd PCT/PTO 16 MAR 2009	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / EP	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau

584

See Notes to the request form

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212: see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51*bis*.1(a)(ii), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to this international application,

HALOZYME, INC. is entitled to apply for and be granted a patent
by virtue of the following:
(1) Assignment from
Halozyme Therapeutics, Inc., 11388 Sorrento Valley Road, San Diego, California 92121, USA
to Halozyme, Inc. dated 12 March 2009
&
(2) Assignment from
FROST, Gregory I., 13662 Mercado Drive, Del Mar, California 92014, United States of America
to Halozyme Therapeutics, Inc. dated 12 March 2009

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

Box No. VIII (iii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO CLAIM PRIORITY

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 213; see Notes to Boxes Nos. VII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51*bis*.1(a)(iii)):

in relation to this international application,

(1) BAXTER HEALTHCARE, S.A. and
(2) BAXTER INTERNATIONAL, INC. are entitled to claim priority of earlier application
No. 61/069,841 filed in US on 17 March 2008 (17.03.08)
Assignment from
SCHIFF, Richard, 12916 Sunny Lane, Santa Rosa Valley, California 93012, United States of America; and
LEIBL, Heinz, Kininger Gasse 12, A-1120, Vienna, Austria
to Baxter Healthcare, S.A. and Baxter International, Inc. 19 December 2008 and 22 December 2008

&
(3) HALOZYME, INC. is entitled to claim priority of earlier application
No. 61/069,841 filed in US on 17 March 2008 (17.03.08)
Assignment from
Halozyme Therapeutics, Inc., 11388 Sorrento Valley Road, San Diego, California 92121, USA
to Halozyme, Inc. dated 05 January 2009
&
assignment from
FROST, Gregory I., 13662 Mercado Drive, Del Mar, California 92014, United States of America
to Halozyme Therapeutics, Inc. dated 05 January 2009

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iii)".

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 September 2009 (24.09.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/117085 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 9/26* (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/001670

(22) International Filing Date:
16 March 2009 (16.03.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/069,841 17 March 2008 (17.03.2008) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **BAXTER HEALTHCARE, S.A.** [CH/CH]; Hertistrasse 2, CH-8306 Wallisellen Kanton, Zurich (CH). **BAXTER INTERNATIONAL, INC.** [US/US]; One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015 (US). **HALOZYME, INC.** [US/US]; 11388 Sorrento Valley Road, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **SCHIFF, Richard** [US/US]; 12916 Sunny Lane, Santa Rosa Valley, CA 93012 (US). **LEIBL, Heinz** [AT/AT]; Kininger Gasse 12, A-1120 Vienna (AT). **FROST, Gregory, I.** [US/US]; 13662 Mercado Drive, Del Mar, CA 92014 (US).

(74) Agents: **SEIDMAN, Stephanie, L.** et al.; K&l Gates LLP, 3580 Carmel Mountain Road, Suite 200, San Diego, CA 92130 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

WO 2009/117085 A1

(54) Title: COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

(57) Abstract: Provided are combinations, compositions and kits containing a immune globulin (IG) composition and a soluble hyaluronidase composition formulated for subcutaneous administration. Such products can be used in methods of treating IG-treatable diseases or conditions. Also provided are methods for subcutaneous administration of immune globulin whereby the dosing regimen is substantially the same as for intravenous administration of the same dosage for treatment of the same IG-treatable disease or condition.

582

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/001670

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 A61K38/47 C07K16/06 C12N9/26 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K C12N A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MELAMED I R ET AL: "Recombinant human hyaluronidase facilitates dispersion of subcutaneously administered Gammagard liquid and enables administration of a full monthly bose in a single site to patients with immunodeficiency diseases" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 121, no. 2, Suppl. 1, February 2008 (2008-02), page S83, XP002541721 & 64TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ACADEMY-OF-ALLERGY-ASTHMA-AND-IMMUNOLOGY; PHILADELPHIA, PA, USA; MARCH 14-18, 2008 ISSN: 0091-6749 the whole document	1-119

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 August 2009	31/08/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Luyten, Kattie

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

588

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/001670

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/091871 A1 (HALOZYME THERAPEUTICS INC [US]; BOOKBINDER LOUIS H [US]; KUNDU ANIRBAN) 31 August 2006 (2006-08-31)	1-9, 11-24, 26-38, 40-67, 69-113, 115-119
A	[0067-0069], [0444-0446]claims 80, 82, 86, 146, 151; examples 2-6, 19	10,25, 39,68, 114
Y	BOOKBINDER L H ET AL: "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 114, no. 2, 28 August 2006 (2006-08-28), pages 230-241, XP024957594 ISSN: 0168-3659 [retrieved on 2006-08-28] the whole document	1-119
Y	ANN GARDULF ET AL: "Rapid Subcutaneous IgG Replacement Therapy is Effective and Safe in Children and Adults with Primary Immunodeficiencies-A Prospective, Multi-National Study" JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 26, no. 2, 26 April 2006 (2006-04-26) , pages 177-185, XP019400116 ISSN: 1573-2592 cited in the application the whole document	1-119
Y	HANS D OCHS ET AL: "Safety and Efficacy of Self-Administered Subcutaneous Immunoglobulin in Patients with Primary Immunodeficiency Diseases" JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 26, no. 3, 2 June 2006 (2006-06-02), pages 265-273, XP019400135 ISSN: 1573-2592 cited in the application the whole document	1-119

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/001670

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	LEESCH V W ET AL: "30-Day Pharmacokinetic Evaluation of IV versus Subcutaneous Administration of Immunoglobulin with and without Recombinant Human Hyaluronidase in Dogs" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 123, no. 2, Suppl. S, February 2009 (2009-02), page S10, XP002541722 & 65TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ACADEMY-OF-ALLERGY-ASTHMA-AND-IMMUNOLOGY; WASHINGTON, DC, USA; MARCH 13-17, 2009 ISSN: 0091-6749 the whole document	1-119
A	Anonymous: "GAMMAGARD LIQUID [Immune Globulin Intravenous (Human)] 10%" Baxter April 2005 (2005-04), pages 1-4, XP002542175 Retrieved from the Internet: URL:http://www.baxter.com/products/biopharmaceuticals/downloads/gamliquid_PI.pdf> [retrieved on 2009-08-20] page 1, left-hand column	1-119
A	JOSEPH A CHURCH ET AL: "Efficacy, Safety and Tolerability of a New 10% Liquid Intravenous Immune Globulin [IGIV 10%] in Patients with Primary Immunodeficiency" JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 26, no. 4, 17 May 2006 (2006-05-17), pages 388-395, XP019400139 ISSN: 1573-2592 the whole document	1-119

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/001670

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006091871 A1	31-08-2006	AU 2006216545 A1	31-08-2006
		CA 2598823 A1	31-08-2006
		CN 101163717 A	16-04-2008
		EA 200701791 A1	28-02-2008
		EP 1858926 A1	28-11-2007
		JP 2008531017 T	14-08-2008
		KR 20080004473 A	09-01-2008

591

Attorney's Dock[illegible]o.: 0119374-00095 / 3058PC

PATENT COOPERATION TREATY
BEFORE THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
EUROPEAN PATENT OFFICE

In re International Application of:
HALOZYME, INC.
International Application No.:
PCT/US2009/001670
Filed : 16 March 2009
Title : COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

Priority Data : U.S. Provisional 61/069,841
Filed: 17 March 2008

VIA FACSIMILE TRANSMISSION (011 31-70-340-3016) AND INTERNATIONAL FEDERAL EXPRESS

European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
NETHERLANDS
Attention: ISA/EP

EPO - DG 1

26. 06. 2009

(43)

REQUEST FOR RECTIFICATION OF OBVIOUS ERRORS

Sir:

This request is being sent via facsimile and International Federal Express (package containing the original of this Request, the replacement pages and the hand-annotated pages) on 23 June 2009 (23.06.09). Pursuant to PCT Rule 91.1, Applicant respectively submits this Request for Rectification of Obvious Errors to correct obvious typographical, spelling and grammatical errors in the specification and claims as originally filed in the above-captioned International application.

CERTIFICATE OF FACSIMILE & MAILING

I hereby certify that this paper and the attached papers are being transmitted by facsimile to the European Patent Office EPO at 31-70-340-3016, AND original by Federal Express, on the date shown below.

Date: 23 June 2009 Christopher Ochs

592

Applicant : HALOZYME, INC.
Serial No. : PCT/US2009/001670
Filed : 16 March 2009

Attorney's Dc[illegible]t No.: 0119374-00095/3058PC
Request for Rectification of Obvious Errors

In the Specification:

Page 1:

Rectification of the obvious typographical errors on Page 1 of the above-captioned International Application is requested.

In lines 9-10, the phrase "This application is related to U.S. Application Serial No. (Attorney Dkt. No. 0119374-00084/ 3058)..." has been rectified to read as –This application is related to U.S. Application Serial No. 12/381,844– to incorporate the now-available application serial number.

This error has been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 1, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 1.

Page 3:

Rectification of the obvious spelling error on Page 3 of the above-captioned International Application is requested.

In line 25, the word "poloyl" has been rectified to read as –polyol– to correct the obvious spelling error.

This error has been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 3, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 3.

Page 4:

Rectification of the obvious spelling errors on Page 4 of the above-captioned International Application is requested.

In line 3, the word "hyalurondiase" has been rectified to read as –hyaluronidase– to correct the obvious spelling error.

In line 10, the word "hylauronidase" has been rectified to read as –hyaluronidase– to correct the obvious spelling error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 4, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 4.

Page 5:

Rectification of the obvious spelling errors on Page 5 of the above-captioned International Application is requested.

In line 4, the word "hypogammglobulinemia" has been rectified to read as –hypogammaglobulinemia– to correct the obvious spelling error.

In line 5, the word "cerebrellar" has been rectified to read as –cerebellar– to correct the obvious spelling error.

In line 23, the word "hyalurondiase" has been rectified to read as –hyaluronidase– to correct the obvious spelling error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 5, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 5.

Page 10:

Rectification of the obvious typographical errors on Page 10 of the above-captioned International Application is requested.

In line 15, the phrase "...mouse (SEQ ID NOS:17-19, 31)..." has been rectified to read as –mouse (SEQ ID NOS:17-19, 32)– to rectify an obvious typographical error in which the sequence identifier of exemplary mouse hyaluronidase was inadvertently set forth as SEQ ID NO:31 rather than SEQ ID NO:32. Basis for the amendment can be found in the Sequence Listing where the sequence set forth in SEQ ID NO:31 is the sequence for rat PH20 whereas the sequence set forth in SEQ ID NO:32 is the sequence of mouse PH20. Thus, amendment of the SEQ ID NO corrects the typographical error.

In lines 15-16, the phrase "...rat (SEQ ID NOS:22-24, 30)..." has been rectified to read as –rat (SEQ ID NOS:22-24, 31)– to rectify an obvious typographical error in which the sequence identifier of exemplary rat hyaluronidase was inadvertently set forth as SEQ ID NO:30 rather than SEQ ID NO:31. Basis for the amendment can be found in the Sequence Listing where the sequence set forth in SEQ ID NO:30 is the sequence for guinea pig PH20 whereas the sequence set forth in SEQ ID NO:31 is the sequence for rat PH20. Thus, amendment of the SEQ ID NO corrects the typographical error.

In lines 17-18, the phrase "...guinea pig (SEQ ID NO:32)..." has been rectified to read as –guinea pig (SEQ ID NO:30)– to rectify an obvious typographical error in which the sequence

identifier of exemplary guinea pig hyaluronidase was inadvertently set forth as SEQ ID NO:32 rather than SEQ ID NO:30. Basis for the amendment can be found in the Sequence Listing where the sequence set forth in SEQ ID NO:32 is the sequence for mouse PH20 whereas the sequence set forth in SEQ ID NO:30 is the sequence for guinea pig PH20. Thus, amendment of the SEQ ID NO corrects the typographical error.

In line 29, the phrase "...at least 40%, 45%, 50%, 55%, 65%,..." has been rectified to read as –at least 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%,– to correct the obvious typographical error in the sequence of numbers from 40% to 99%, where 60% is inadvertently omitted.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 10, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 10.

Page 11:

Rectification of the obvious spelling errors on Page 11 of the above-captioned International Application is requested.

In line 3, the word "farnysylation" has been rectified to read as –farnesylation– to rectify the obvious spelling error.

In line 8, the word "partioning" has been rectified to read as –partitioning– to rectify the obvious spelling error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 11, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 11.

Page 33:

Rectification of the obvious spelling error on Page 33 of the above-captioned International Application is requested.

In line 14, the word "amphihilic" has been rectified read as –amphiphilic– to correct the obvious spelling error.

This error has been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 33, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 33.

Page 34:

Rectification of the obvious spelling errors on Page 34 of the above-captioned International Application is requested.

In line 17, the word "chromatrography" has been rectified to read as –chromatography– to correct the obvious spelling error.

In line 19, the word "nanofiltartion" has been rectified to read as –nanofiltration– to correct the obvious spelling error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 34, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 34.

Page 35:

Rectification of the obvious typographical errors on Page 35 of the above-captioned International Application is requested.

In line 9, the phrase "...mouse (SEQ ID NOS:17-19, 31)..." has been rectified to read as –mouse (SEQ ID NOS:17-19, 32)– to rectify an obvious typographical error in which the sequence identifier of exemplary mouse hyaluronidase was inadvertently set forth as SEQ ID NO:31 rather than SEQ ID NO:32. Basis for the amendment can be found in the Sequence Listing where the sequence set forth in SEQ ID NO:31 is the sequence for rat PH20 whereas the sequence set forth in SEQ ID NO:32 is the sequence of mouse PH20. Thus, amendment of the SEQ ID NO corrects the typographical error.

In lines 9-10, the phrase "...rat (SEQ ID NOS:22-24, 30)..." has been rectified to read as –rat (SEQ ID NOS:22-24, 31)– to rectify an obvious typographical error in which the sequence identifier of exemplary rat hyaluronidase was inadvertently set forth as SEQ ID NO:30 rather than SEQ ID NO:31. Basis for the amendment can be found in the Sequence Listing where the sequence set forth in SEQ ID NO:30 is the sequence for guinea pig PH20 whereas the sequence set forth in SEQ ID NO:31 is the sequence for rat PH20. Thus, amendment of the SEQ ID NO corrects the typographical error.

In lines 11-12, the phrase "...guinea pig (SEQ ID NO:32)..." has been rectified to read as –guinea pig (SEQ ID NO:30)– to rectify an obvious typographical error in which the sequence identifier of exemplary guinea pig hyaluronidase was inadvertently set forth as SEQ ID NO:32 rather than SEQ ID NO:30. Basis for the amendment can be found in the Sequence Listing

where the sequence set forth in SEQ ID NO:32 is the sequence for mouse PH20 whereas the sequence set forth in SEQ ID NO:30 is the sequence for guinea pig PH20. Thus, amendment of the SEQ ID NO corrects the typographical error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 35, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 35.

Page 49:

Rectification of the obvious spelling error on Page 49 of the above-captioned International Application is requested.

In line 20, the word "syntase" has been rectified to read as –synthase– to correct the obvious spelling error.

This error has been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 49, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 49.

Page 52:

Rectification of the obvious spelling error on Page 52 of the above-captioned International Application is requested.

In line 31, the word "polvinylpyrrolidine" has been rectified to read as –polyvinylpyrrolidine– to correct the obvious spelling error.

This error has been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 52, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 52.

Page 94:

Rectification of the obvious typographical error on Page 94 of the above-captioned International Application is requested.

In line 8, the phrase "...endotoxin (LAL assay." has been rectified to reads as –endotoxin (LAL assay).– to correct the obvious typographical error.

This error has been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 94, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 94.

Page 101:

Rectification of the obvious spelling errors on Page 101 of the above-captioned International Application is requested.

In line 7, the word "smpled" has been rectified to read as –sampled– to correct the obvious spelling error.

In line 29, the word "Viosart" has been rectified to read as –Virosart– to correct the obvious spelling error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 101 and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 101.

In the Claims:

Page 106:

Rectification of the obvious s punctuation and spelling errors on Page 106 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 12, in line 6, the phrase "ovine bovine or truncated..." has been rectified to read as –ovine, bovine or truncated– to correct the obvious punctuation error.

In claim 22, in line 29, the word "poloyl" has been rectified to read as –polyol– to correct the obvious spelling error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 106, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 106.

Page 108:

Rectification of the obvious punctuation and spelling errors on Page 108 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 30, in line 4, the phrase "...and a bacterial viral or fugal infection." has been rectified to read as –and a bacterial, viral or fungal infection.– to correct the obvious punctuation and spelling errors.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 108, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 108.

Page 109:

Rectification of the obvious punctuation and spelling errors on Page 109 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 44, in line 30, the phrase "...and a bacterial viral or fugal..." has been rectified to read as –and a bacterial, viral or fungal – to correct the obvious punctuation and spelling errors.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 109, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 109.

Page 110:

Rectification of the obvious spelling and punctuation errors on Page 110 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 45, in line 4, the word "cerebrellar" has been rectified to read as –cerebellar– to correct the obvious spelling error.

In claim 48, in line 13, the phrase "...the bacterial viral or fungal..." has been rectified to read as –the bacterial, viral or fungal– to correct the obvious punctuation error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 110, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 110.

Page 111:

Rectification of the obvious punctuation and spelling errors on Page 111 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 50, in lines 6-7, the phrase "...and a bacterial viral or fugal infection." has been rectified to read as –and a bacterial, viral or fungal infection.– to correct the obvious punctuation and spelling errors.

In claim 51, in line 14, the word "cerebrellar" has been rectified to read as –cerebellar– to correct the obvious spelling error.

In claim 54, in line 25, the phrase "...and the bacterial viral..." has been rectified to read as –and the bacterial, viral– to correct the obvious punctuation error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 111, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 111.

Page 112:

Rectification of the obvious punctuation error on Page 112 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 61, in line 18, the phrase "ovine bovine or truncated..." has been rectified to read as –ovine, bovine or truncated– to correct the obvious punctuation error.

This error has been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 112, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 112.

Page 114:

Rectification of the obvious typographical error on Page 114 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 78, in line 3, the phrase "...Units,, 50,000..." has been rectified to read as – Units, 50,000– to correct the obvious typographical error.

This error has been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 114, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 114.

Page 115:

Rectification of the obvious spelling and punctuation errors on Page 115 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 88, in line 11, the word "hyalurondiase" has been rectified to read as – hyaluronidase– to correct the obvious spelling error.

In claim 89, in lines 13-14, the phrase "...from an ovine bovine..." has been rectified to read as –from an ovine, bovine– to correct the obvious punctuation error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 115, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 115.

Page 116:

Rectification of the obvious spelling error on Page 116 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 99, in line 4, the word "poloyl" has been rectified to read as –polyol– to correct the obvious spelling error.

This error has been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 116, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 116.

Page 117:

Rectification of the obvious spelling error on Page 117 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 113, in line 4, the word "hylauronidase" has been rectified to read as –hyaluronidase– to correct the obvious spelling error.

This error has been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 117, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 117.

Page 118:

Rectification of the obvious spelling and punctuation errors on Page 118 of the above-captioned International Application is requested.

In claim 116, in line 2, the word "cerebrellar" has been rectified to read as –cerebellar– to correct the obvious spelling error.

In claim 119, in line 12, the phrase "...the bacterial viral or fungal" has been rectified to read as –the bacterial, viral or fungal– to correct the obvious punctuation error.

These errors have been noted on the enclosed hand-annotated copy of Page 118, and the rectification is provided in the enclosed Replacement Sheet for Page 118.

Applicant : HALOZYME, INC.
Serial No. : PCT/US2009/001670
Filed : 16 March 2009

Attorney's Docket No.: 0119374-00095/3058PC
Request for Rectification of Obvious Errors

REMARKS

Applicant respectfully requests entry of the corrections in the above-captioned International Application. Pursuant to PCT Rule 91.1, these corrections do not add new matter to the application. Applicant further requests authorization and notification of the authorization to reach the International Bureau before 17 August 2009, i.e. 17 months from the priority date of the above-captioned International Application.

Respectfully submitted,

Stephanie Seidman
Reg. No. 33,779

Dated: 23 June 2009
Attorney Docket No. 0119374-00095/3058PC

Address all correspondence to :
Stephanie Seidman
K&L Gates LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130-6766
Telephone: (858) 509-7410
Facsimile: (858) 509-7466
Email: stephanie.seidman@klgates.com

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/117085
PCT/US2009/001670

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

SEIDMAN, Stephanie, L.
K&L Gates LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, CA 92130
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
22 July 2010 (22.07.2010)

Applicant's or agent's file reference
0119374-095 (3058PC)

IMPORTANT NOTICE

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2009/001670	16 March 2009 (16.03.2009)	17 March 2008 (17.03.2008)

Applicant
BAXTER HEALTHCARE, S.A. et al

1. **ATTENTION**: For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93*bis*.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
24 September 2009 (24.09.2009)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93*bis*.1 :

AE, AG, AL, AM, AO, AP, AT, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BZ, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. **TIME LIMITS for entry into the national phase**

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph,** be **30 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Simin Baharlou 603

e-mail: pt09.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2009/001670

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

SEIDMAN, Stephanie, L.
K&L Gates LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, CA 92130
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
28 January 2010 (28.01.2010)

Applicant's or agent's file reference
0119374-095 (3058PC)

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2009/001670

International filing date *(day/month/year)*
16 March 2009 (16.03.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

BAXTER HEALTHCARE, S.A.
Hertistrasse 2
CH-8306 Wallisellen Kanton, Zurich
Switzerland

State of Nationality	State of Residence
CH	CH

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

BAXTER HEALTHCARE, S.A.
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark (Opfikon)
Switzerland

State of Nationality	State of Residence
CH	CH

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☒ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 71 30

Authorized officer
Takeuchi Junko
604
e-mail pt09.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 09

11

IN THE INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO

In re		
Applicant(s)	:	HALOZYME, INC.; BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.
International Application No.	:	PCT/US2009/001670
International Filing Date	:	16 March 2009 (16.03.09)
For	:	Combinations And Methods For Subcutaneous Administration Of Immune Globulin And Hyaluronidase
Priority:	:	US Provisional Appln. No. 61/069,841 Filing Date: 17 March 2008 (17.03.08)
Our File Reference	:	0119374-095 (3058PC)

CERTIFICATE OF SERVICE BY FACSIMILE

VIA FACSIMILE NO.: 01141 22338 7130 & 01141223388270
Attention: Simin Baharlou – Team PT09, Authorized Officer
The International Bureau of WIPO
34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, SWITZERLAND

Date: 25 January 2010

Dear Mr. Baharlou

I hereby certify that the following attached paper or fee:

REQUEST PURSUANT TO PCT RULE 92bis FOR RECORDATION OF A CHANGE IN APPLICANTS OF RECORD IN THE INTERNATIONAL APPLICATION

is being sent by facsimile to the International Bureau at Facsimile No. 01141 22338 7130 & 01141223388270, on the date indicated above, and is addressed to the International Bureau of WIPO, Attention: Simin Baharlou

25 January 2010
Date

Mylad S. Boyer
Name of person sending paper or fee

Signature

605

D-1123293 v1

ATTORNEY DOCKET NO. 3800020-095 (3058PC)

IN THE INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO

In re

Applicant(s)	:	HALOZYME, INC.; BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.
International Application No.	:	PCT/US2009/001670
International Filing Date	:	16 March 2009 (16.03.09)
For	:	Combinations And Methods For Subcutaneous Administration Of Immune Globulin And Hyaluronidase
Priority:	:	US Provisional Appln. No. 61/069,841 Filing Date: 17 March 2008 (17.03.08)
Our File Reference	:	0119374-095 (3058PC)

30-MONTH NATIONAL PHASE DEADLINE: 17 September 2010
Via Facsimile No.: 01141 22338 7130 & 01141223388270 & E-Mail (pt09.pct@wipo.int)
Attention: Simin Baharlou – Team PT09, Authorized Officer
The International Bureau of WIPO
34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, SWITZERLAND

REQUEST PURSUANT TO PCT RULE 92bis FOR RECORDATION OF A CHANGE IN APPLICANTS OF RECORD IN THE INTERNATIONAL APPLICATION

Dear Mr. Baharlou:

We note publication of the above-identified international application PCT/US2009/001670 (WO 2009/116975) on 24 September 2009. Please note of a recent change in company's address for one of the named applicants in this international application.

Accordingly, pursuant to PCT Rule 92bis, Applicants request that the International Bureau record a change in address for applicant of record for the subject international application, as follows:

BAXTER HEALTHCARE, S.A.
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark (Opfikon)
Switzerland

This company is one of the three named applicants (co-applicant) for all designated States except US, and duly noted on the original PCT Request filed on 16 March 2009.

606

ATTORNEY DOCKET NO. 3800020-095 (3058PC)

PCT/US2009/001670 – Filed: 16 March 2009
Earliest Priority Date: 17 March 2008
Applicants: **Halozyme, Inc.; Baxter Healthcare, S.A.; Baxter International, Inc.**
REQUEST PURSUANT TO PCT RULE 92bis (change company address)
30-Month National Phase Deadline: 17 September 2010
Continued...Page 2 of 2

This Request is being made prior to **17 September 2010** which is 30 months from the earliest priority date of the International Application. Therefore, in accordance with PCT Rule 92bis, this request is timely submitted. This Request is also being provided to you by e-mail.

Given the 30-month national phase entry deadline, and in order to enter said national phase filings with the correct applicants information before the respective National Patent Offices, Applicants request expedited processing of this PCT Rule 92bis Request. Applicants request issuance of the Form PCT/IB/306 confirming recordal of a change in applicant of record, as well as submission of this Form to all the designated and International Offices. Kindly provide us with the PCT/IB/306 form via return e-mail (stephanie.seidman@klgates.com) and/or facsimile at (858) 509-7460 for immediate processing.

Respectfully Submitted

Date: 25 January 2010 By: Stephanie L. Seidman, Esq.
U.S. Registration No.33,779

Attorney Docket No.: 0119374-095 (3058PC)
K&L GATES LLP *(formerly Bell Boyd & Lloyd)*
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130, USA
Telephone: (858) 509-7400
Facsimile: (858) 509-7460
E-mail: stephanie.seidman@klgates.com

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/117085
PCT/US2009/001670

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

SEIDMAN, Stephanie, L.
K&I Gates LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, CA 92130
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 22 October 2009 (22.10.2009)		
Applicant's or agent's file reference 0119374-095 (3058PC)	**IMPORTANT NOTICE**	
International application No. PCT/US2009/001670	International filing date *(day/month/year)* 16 March 2009 (16.03.2009)	Priority date *(day/month/year)* 17 March 2008 (17.03.2008)
Applicant BAXTER HEALTHCARE, S.A. et al		

1. **ATTENTION**: For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does apply**, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93*bis*.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
24 September 2009 (24.09.2009)

   None

   In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93*bis*.1 :

   LU, TZ, UG

   In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. **TIME LIMITS for entry into the national phase**

   For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of **19 months** from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph,** be **20 MONTHS** from the priority date.

   In practice, **time limits other than the 20-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

   It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Simin Baharlou 608

e-mail: pt09.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:

STEPHANIE L. SEIDMAN
K&L GATES LLP
3580 CARMEL MOUNTAIN ROAD, SUITE 200
SAN DIEGO, CALIFORNIA 92130

PCT

NOTIFICATION CONCERNING PAYMENT OF PRESCRIBED FEES

(PCT Rules 12bis.1(c), 14, 15 and 16 and Administrative Instructions, Sections 102*bis*(c), 304, 323(b), 707(b) and 803)

Date of mailing *(day/month/year)*	04 Jun 2009
Applicant's or agent's file reference: 0119374-095 (3058PC)	**PAYMENT DUE** see item 3 for time limits

International application No.	International filing date/Date of receipt *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2009/001670	16 Mar 2009	17 Mar 2008

Applicant: BAXTER HEALTHCARE, S.A.

1. The applicant is hereby notified that this receiving Office has received:

☒ **the payment** of all the prescribed fees, and ☒ **an overpayment**, which will be refunded in due course.

☐ **no or insufficient payment** of the prescribed fees and the applicant is hereby **invited to pay the balance due**, as summarized under item 2, within the time limit(s) indicated under item 3.

2. **Fees and payment calculation:**

5,910.00	–	5,910.00	=	0.00
Total fees payable		Amount paid		Balance

☐ The details of the calculation are given in the Annex.

3. **Time limit(s) for payment and amount(s) payable (Rules 14.1, 15.4 and 16.1(f)):**

☐ within ONE MONTH from the date of receipt of the international application (**for the transmittal fee** (if any), **the search fee** and **the international filing fee**). The amount payable for each fee is the amount applicable on the date of receipt of the international application.

☐ within 16 MONTHS from the priority date (only for the fee for priority document). The applicant's attention is drawn to the fact that the request made by the applicant under Rule 17.1(b) will be considered not to have been made unless the fee is paid within that time limit.

4. Additional observations *(if necessary)*:

☐ The search copy will not be transmitted to the International Searching Authority until the search fee is paid (therefore the start of the international search will be delayed) (Rule 23.1(a) and (b)).

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	LaShonnah Tyson
Facsimile No. 571-273-3201	Telephone No. 703-756-1445

609

Form PCT/RO/102 (July 2008)

ANNEX TO FORM PCT/RO/102
CALCULATION OF THE PRESCRIBED FEES

International application No.
PCT/US2009/001670

[T] Transmittal Fee

Prescribed amount: . . . . . 240.00 [T]
Amount paid: . . . . . − 240.00
Balance: . . . . . = 0.00

[X] correct amount
[ ] overpayment
[ ] balance due

[S] Search Fee

Prescribed amount: . . . . . 2,164.00 [S]
Amount paid: . . . . . − 2,164.00
Balance: . . . . . = 0.00

[X] correct amount
[ ] overpayment
[ ] balance due

[I] International Filing Fee

Fixed amount for first 30 sheets: . . . . . 1,210.00 [i1]

164 (Number of sheets in excess of 30) x 14.00 (Fee per sheet) = 2,296.00 [i2]

Additional component: . . .400 x 0.00 (Fee per sheet) = 0.00 [i3]

Reduction where the international application is filed *(See PCT Applicant's Guide, International Phase for details on the availability of this reduction)*:

using the PCT-EASY software: . . . . . − 0.00 [r]

or

in electronic form where the text of the description, claims and abstract **is not** in character coded format: . . . . . − 0.00 [r]

or

in electronic form where the text of the description, claims and abstract is in character coded format: . . . . . − 0.00 [r]

Sub-total: . . . . . = 3,506.00 [i1+i2+i3-r]

Applicants from certain States are entitled to a reduction of 90% of the international filing fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 10% of the sub-total entered at (i1+i2+i3-r); (see Notes to the Fee Calculation Sheet as annexed to the Request Form, PCT/RO/101, for details): . . . . . = 3,506.00 [I]

Amount paid: . . . . . − 3,506.00
Balance: . . . . . = 0.00

[X] correct amount
[ ] overpayment
[ ] balance due

[P] Fee for Priority Document

Prescribed amount: . . . . . 0.00 [P]
Amount paid: . . . . . − 0.00
Balance: . . . . . = 0.00

[X] correct amount
[ ] overpayment
[ ] balance due

[ES] Fee for Earlier Search Documents

Prescribed amount: . . . . . 0.00 [ES]
Amount paid: . . . . . − 0.00
Balance: . . . . . = 0.00

[ ] correct amount
[ ] overpayment
[ ] balance due

610

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
STEPHANIE L. SEIDMAN
K&L GATES LLP
3580 CARMEL MOUNTAIN ROAD, SUITE 200
SAN DIEGO, CALIFORNIA 92130

Confirmation No: 6324

PCT

NOTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION NUMBER AND OF THE INTERNATIONAL FILING DATE

(PCT Rule 20.2(c))

Date of mailing *(day/month/year)*	04 Jun 2009
Applicant's or agent's file reference: 0119374-095 (3058PC)	**IMPORTANT NOTIFICATION**

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2009/001670	16 Mar 2009	17 Mar 2008

Applicant: BAXTER HEALTHCARE, S.A.

Title of the invention: COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

1. The applicant is hereby notified that the international application has been accorded the international application number and the international filing date indicated above.

2. The applicant is further notified that the record copy of the international application:

☒ was transmitted to the International Bureau on 04 Jun 2009

☐ has not yet been transmitted to the International Bureau for the reason indicated below and a copy of this notification has been sent to the International Bureau*:

☐ because the necessary national security clearance has not yet been obtained.

☐ because *(reason to be specified)*:

* The International Bureau monitors the transmittal of the record copy by the receiving Office and will notify the applicant (with Form PCT/IB/301) of its receipt. Should the record copy not have been received by the expiration of 14 months from the priority date, the International Bureau will notify the applicant (Rule 22.1(c)).

3. FOREIGN TRANSMITTAL LICENSE INFORMATION Completed by: LT

☐ Additional license for foreign transmittal not required. This subject matter is covered by a license already granted or the equivalent U.S. national application. Refer to that license for information concerning its scope.

☐ License for foreign transmittal not required. 37 CFR 5.11(e)(1) or 37 CFR 5.11(e)(2). However, a license may be required for additional subject matter. See 37 CFR 5.15(b).

☒ Foreign transmittal license granted. 35 U.S.C. 184; 37 CFR 5.11 on 29 May 2009 (date):

☐ 37 CFR 5.15(a) ☒ 37 CFR 5.15(b)

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	LaShonnah Tyson
Facsimile No. 571-273-3201	Telephone No. 703-756-1445

611

Form PCT/RO/105 (July 2008)

PATENT COOPERATION TREATY

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

IN RE an international application
based upon the United States
Patent applications identified as:

Applicants: BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.; HALOZYME, INC.

Inventors: Richard SCHIFF; Heinz LEIBL; Gregory I. FROST

International Application entitled:

COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

International Application No.:
International Filing Date:

Priority: U.S. Provisional Application No. 61/069,841
Filed: 17 March 2008 (17.03.08)

Our Attorney Docket No.: **0119374-095 (3058PC)**

POWER OF ATTORNEY

Commissioner for Patent
Mail Stop PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

The undersigned applicant hereby revokes all prior appointments of agents or representatives, and appoints the following attorneys and agents as applicant's agent to act on applicant's behalf before the competent International Authorities in connection with the international application identified above, and requests that all correspondence in respect to this application be directed to them at K&L GATES LLP, 3580 Carmel Mountain Road, Suite 200, San Diego, California 92130, U.S.A.:

612

PCT POWER (HALOZYME)
Continued...Page 2

Attorney/Agent	U.S. Registration No.
Stephanie L. Seidman	33,779
Frank J. Miskiel	53, 332
Karen G. Potter	57, 254

Address for correspondence:

Stephanie L. Seidman, Esq.
K&L GATES LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130
Telephone: (858) 509-7400
Facsimile: (858) 509-7460
E-mail: stephanie.seidman@klgates.com

HALOZYME, INC.

Place: San Diego, CA USA

By: _____

Name:

Title: Gregory I. Frost, Ph.D. Vice President & CSO

Date: March 12, 2009

613

PATENT COOPERATION TREATY

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

IN RE an international application
based upon the United States
Patent applications identified as:

Applicants: BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.; HALOZYME, INC.

Inventors: Richard SCHIFF; Heinz LEIBL; Gregory I. FROST

International Application entitled:

COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

International Application No.:
International Filing Date:

Priority: U.S. Provisional Application No. 61/069,841
Filed: 17 March 2008 (17.03.08)

Our Attorney Docket No.: **0119374-095 (3058PC)**

POWER OF ATTORNEY

Commissioner for Patent
Mail Stop PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

The undersigned applicant hereby revokes all prior appointments of agents or representatives, and appoints the following attorneys and agents as applicant's agent to act on applicant's behalf before the competent International Authorities in connection with the international application identified above, and requests that all correspondence in respect to this application be directed to them at K&L GATES LLP, 3580 Carmel Mountain Road, Suite 200, San Diego, California 92130, U.S.A.:

614

PCT POWER (INVENTORS)
Continued...Page 2

Attorney/Agent	U.S. Registration No.
Stephanie L. Seidman	33,779
Frank J. Miskiel	53, 332
Karen G. Potter	57, 254

Address for correspondence:

Stephanie L. Seidman, Esq.
K&L GATES LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130
Telephone: (858) 509-7400
Facsimile: (858) 509-7460
E-mail: stephanie.seidman@klgates.com

(1) RICHARD SCHIFF
Place:
_____ _____
Signature

Date:_____

(2) HEINZ LEIBL
Place:
_____ _____
Signature

Date:_____

(3) GREGORY I. FROST
Place: San Diego, CA USA
_____
Signature

Date: March 12, 2009

615

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2009/001670

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

SEIDMAN, Stephanie, L.
K&I Gates LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, CA 92130
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*	**IMPORTANT NOTIFICATION**
24 June 2009 (24.06.2009)	
Applicant's or agent's file reference	International application No.
0119374-095 (3058PC)	PCT/US2009/001670

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

BAXTER HEALTHCARE, S.A. et al (for all designated States except US)
SCHIFF, Richard et al (for US)

International filing date: 16 March 2009 (16.03.2009)
Priority date(s) claimed: 17 March 2008 (17.03.2008)
Date of receipt of the record copy by the International Bureau: 17 June 2009 (17.06.2009)
List of designated Offices:

AP: BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR
OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

ATTENTION: The applicant should carefully check the data appearing in this notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau. **In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex**, relating to:

- time limits for entry into the national phase - **see updated important information (as of April 2002)**
- requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 71 30

Authorized officer
Guadagnino Christine
e-mail pt09.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 09

616

ANNEX TO FORM PCT/IB/301

International application No.
PCT/US2009/001670

INFORMATION ON ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the **"national phase" must be entered** before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with **other special requirements** applicable in certain Offices. It is the **applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The **applicable time limit** for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph,** be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time**, in respect of certain designated or elected Offices. For **regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit)**, Office by Office, refer to the *PCT Gazette* ("Section IV" part published on a weekly basis), to the *PCT Newsletter* (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the *PCT Applicant's Guide* (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages of the site, including those of the *Gazette*, *Newsletter* and *Guide*, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

Information about the requirements for **filing a demand for international preliminary examination** is set out in the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before the date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau and if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances (Rule 17.1(c)).

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit (and all other PCT time limits) is the filing date of the earliest application whose priority is claimed (Article 2(xi)(b)).

612

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SEIDMAN, Stephanie, L.
K&I Gates LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, CA 92130
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 25 June 2009 (25.06.2009)	
Applicant's or agent's file reference 0119374-095 (3058PC)	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/US2009/001670	International filing date *(day/month/year)* 16 March 2009 (16.03.2009)
International publication date *(day/month/year)* **Not yet published**	Priority date *(day/month/year)* 17 March 2008 (17.03.2008)
Applicant BAXTER HEALTHCARE, S.A. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote **a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau** under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)***An asterisk (*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes **a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b)** (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
17 March 2008 (17.03.2008)	61/069,841	US	04 June 2009 (04.06.2009)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Simin Baharlou 618
e-mail PT09.PCT@WIPO.INT
Telephone No. +41 22 338 74 09

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

BELL, BOYD & LLOYD LLP
Attn. Seidman, Stephanie L.
3580 Carmel Mountain Road
Suite 200
San Diego, CA 92130-9015
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF DECISION CONCERNING
REQUEST FOR RECTIFICATION

(PCT Rule 91.3(a) and (d))

Applicant's or agent's file reference 0119374-095 (3058PC)	Date of mailing *(day/month/year)* 07/07/2009
International application N°. PCT/US2009/001670	**REPLY DUE** NONE However, see last paragraph below
Applicant BAXTER HEALTHCARE, S.A.	International filing date *(day/month/year)* 16/03/2009

The applicant is hereby notified that this International Searching Authority has considered the request for rectification of obvious errors in the International application/in other papers submitted by the applicant to this Authority, and that it has decided:

1. a. [X] to authorize the rectification:

   [X] as requested by the applicant.

   [ ] to the extent set forth below*:

b. [X] The rectification **will be or has been taken into account** for the purposes of the international search (Rule 43.6*bis* (a)).

   [ ] The rectification **has not been taken into account** because it was authorized by this Authority after this Authority has begun to draw up the international search report (Rule 43.6*bis* (b)).

2. [ ] to refuse to authorize the rectification or part of it for the following reasons*:

A copy of this notification, together with a copy of the applicant's request for rectification, has been sent to the receiving Office and to the International Bureau:

* **If the authorization of the rectification has been refused in whole or in part,** the applicant may request the International Bureau, within two months from the date of the refusal and subject to the payment of a special fee, to publish the request for rectification and the reasons for refusal by this Authority and any further brief comments that may be submitted by the applicant together with the international application. See rule 91.3(d) and, for the amount of the fee, see the **PCT Applicant's Guide,** Volume I, Annex B2(IB).

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Nathalie Didenot

619

Form PCT/ISA/217 (April 2007)

****** RECORD COPY ******

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
0119374-095 (3058PC)		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2009/001670	16/03/2009	17/03/2008
Applicant		
BAXTER HEALTHCARE, S.A.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

[X] the international application in the language in which it was filed

[ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. [X] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

[X] the text is approved as submitted by the applicant

[ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

[X] the text is approved as submitted by the applicant

[ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

[ ] as suggested by the applicant

[ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

[ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

620

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/001670

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [X] filed together with the international application in electronic form

   [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

621

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/001670

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 A61K38/47 C07K16/06 C12N9/26 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K C12N A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MELAMED I R ET AL: "Recombinant human hyaluronidase facilitates dispersion of subcutaneously administered Gammagard liquid and enables administration of a full monthly bose in a single site to patients with immunodeficiency diseases" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 121, no. 2, Suppl. 1, February 2008 (2008-02), page S83, XP002541721 & 64TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ACADEMY-OF-ALLERGY-ASTHMA-AND-IMMUNOLOGY; PHILADELPHIA, PA, USA; MARCH 14-18, 2008 ISSN: 0091-6749 the whole document	1-119

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 August 2009	31/08/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Luyten, Kattie

622

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/001670

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/091871 A1 (HALOZYME THERAPEUTICS INC [US]; BOOKBINDER LOUIS H [US]; KUNDU ANIRBAN) 31 August 2006 (2006-08-31)	1-9, 11-24, 26-38, 40-67, 69-113, 115-119
A	[0067-0069], [0444-0446]claims 80, 82, 86, 146, 151; examples 2-6, 19	10,25, 39,68, 114
Y	BOOKBINDER L H ET AL: "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 114, no. 2, 28 August 2006 (2006-08-28), pages 230-241, XP024957594 ISSN: 0168-3659 [retrieved on 2006-08-28] the whole document	1-119
Y	ANN GARDULF ET AL: "Rapid Subcutaneous IgG Replacement Therapy is Effective and Safe in Children and Adults with Primary Immunodeficiencies-A Prospective, Multi-National Study" JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 26, no. 2, 26 April 2006 (2006-04-26) , pages 177-185, XP019400116 ISSN: 1573-2592 cited in the application the whole document	1-119
Y	HANS D OCHS ET AL: "Safety and Efficacy of Self-Administered Subcutaneous Immunoglobulin in Patients with Primary Immunodeficiency Diseases" JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 26, no. 3, 2 June 2006 (2006-06-02), pages 265-273, XP019400135 ISSN: 1573-2592 cited in the application the whole document	1-119

-/--

693

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/001670

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	LEESCH V W ET AL: "30-Day Pharmacokinetic Evaluation of IV versus Subcutaneous Administration of Immunoglobulin with and without Recombinant Human Hyaluronidase in Dogs" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 123, no. 2, Suppl. S, February 2009 (2009-02), page S10, XP002541722 & 65TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ACADEMY-OF-ALLERGY-ASTHMA-AND-IMMUNOLOGY; WASHINGTON, DC, USA; MARCH 13-17, 2009 ISSN: 0091-6749 the whole document	1-119
A	Anonymous: "GAMMAGARD LIQUID [Immune Globulin Intravenous (Human)] 10%" Baxter April 2005 (2005-04), pages 1-4, XP002542175 Retrieved from the Internet: URL:http://www.baxter.com/products/biopharmaceuticals/downloads/gamliquid_PI.pdf> [retrieved on 2009-08-20] page 1, left-hand column	1-119
A	JOSEPH A CHURCH ET AL: "Efficacy, Safety and Tolerability of a New 10% Liquid Intravenous Immune Globulin [IGIV 10%] in Patients with Primary Immunodeficiency" JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 26, no. 4, 17 May 2006 (2006-05-17), pages 388-395, XP019400139 ISSN: 1573-2592 the whole document	1-119

624

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/001670

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006091871 A1	31-08-2006	AU 2006216545 A1	31-08-2006
		CA 2598823 A1	31-08-2006
		CN 101163717 A	16-04-2008
		EA 200701791 A1	28-02-2008
		EP 1858926 A1	28-11-2007
		JP 2008531017 T	14-08-2008
		KR 20080004473 A	09-01-2008

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/117085
PCT/US2009/001670

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
AVAILABILITY OF THE PUBLICATION
OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

To:

SEIDMAN, Stephanie, L.
K&I Gates LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, CA 92130
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*	
24 September 2009 (24.09.2009)	
Applicant's or agent's file reference 0119374-095 (3058PC)	**IMPORTANT NOTICE**

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2009/001670	16 March 2009 (16.03.2009)	17 March 2008 (17.03.2008)

Applicant
BAXTER HEALTHCARE, S.A. et al

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau:

☑ has **published** the above-indicated international application on 24 September 2009 (24.09.2009) under No. WO 2009/117085

☐ has **republished** the above-indicated international application on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (*as the case may be*) on the front page of the published international application.

A copy of the international application is available for viewing and downloading on WIPO's website at the following address: www.wipo.int/pctdb (in the appropriate field of the structured search, enter the PCT or WO number).

The applicant may also obtain a paper copy of the published international application from the International Bureau by sending an e-mail to patentscope@wipo.int or by submitting a written request to the contact details provided below.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Simin Baharlou

e-mail: pt09.pct@wipo.int

626

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE (RO/US)

In re		
Applicant(s)	:	BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC. HALOZYME, INC.
International Application No.	:	PCT/US2009/001670
International Filing Date	:	16 March 2009 (16.03.09)
For	:	Combinations and Methods for Subcutaneous Administration of Immune Globulin and Hyaluronidase
Priority	:	US Provisional 61/069,841 Filed: 17 March 2008 (17.03.08))
Customer No.	:	77202
Our File Reference	:	**0119374-095 (3058PC)**

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450 - Mail Stop PCT
Alexandria, Virginia 22313-1450
Attention: LaShonnah Tyson
PCT International Application Processing Division - RO/US

LETTER TO RECEIVING OFFICE, INCLUDING SUBMISSION OF PCT POWERS OF ATTORNEY (RULE 90) IN THE INTERNATIONAL APPLICATION

Dear Sir/Madam:

Applicants acknowledge receipt of PCT/RO/105 dated 04 June 2009 confirming the new application number and filing date accorded to the subject international application, PCT/US2009/001670. Please note that the Receiving Office did not issue an Invitation to Correct Defects in the International Application. However, applicants are aware of the signature requirements in connection with the filings of international applications.

Certification under 37 CFR 1.10 (if applicable)

EM315453337US — "Express Mail" mailing number

16 JULY 2009 — Date of Deposit

I hereby certify that this paper and any attached papers or fee is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to the Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Mail Stop PCT, Alexandria, Virginia 22313-1450, Attn: RO/US.

STEFANIE DOST — (Typed or printed name of person mailing application)

Stefanie Dost — (Signature of person mailing application)

627

PCT/US2009/001670 - Int'l Filing Date: 16 March 2009
BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.; HALOZYME, INC.
Communication to Receiving Office
Powers of Attorney (Applicants)
17 July 2009
Continued...Page 2

Under the recent changes in the PCT Rules effected January 2004, it is applicants understanding that an international application will be considered to satisfy signature requirements if it is signed by at least one applicant who is entitled to file with the Receiving Office. The appointed agent signed the original PCT Request and no executed Powers of Attorney were submitted with the filing of the international application.

In order to complete PCT formalities, submitted herewith are duly executed Powers of Attorney documents from the named Applicants, BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.; HALOZYME, INC., as well as inventors Schiff, Leibl and Frost, who are co-applicants for the purposes of the US designation only. All formalities should be completed in this case.

> Applicants note that there is no fee due with respect to the filing of this Communication. However, The Commissioner is hereby authorized to charge any fees that may become due in connection with this, and any attached papers, or to credit any overpayment to Deposit Account No. 02-1818.

Respectfully submitted,

Date: 16 July 2009

By: Stephanie L. Seidman, Esq.
U.S. Registration No. 33,779
Attorney for Applicants

Attorney Docket: 0119374-095 (3058PC)
K&L GATES LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130
United States of America
Telephone: (858) 509-7400
Facsimile: (202) 509-7460
E-Mail: stephanie.seidman@klgates.com

628

PATENT COOPERATION TREATY

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

IN RE an international application
based upon the United States
Patent applications identified as:

Applicants: BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.; HALOZYME, INC.

Inventors: Richard SCHIFF; Heinz LEIBL; Gregory I. FROST

International Application entitled:

COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

International Application No.: PCT/US2009/001670
International Filing Date: 16 March 2009

Priority: U.S. Provisional Application No. 61/069,841
Filed: 17 March 2008 (17.03.08)

Our Attorney Docket No.: **0119374-095 (3058PC)**

POWER OF ATTORNEY

Commissioner for Patent
Mail Stop PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

The undersigned applicant hereby revokes all prior appointments of agents or representatives, and appoints the following attorneys and agents as applicant's agent to act on applicant's behalf before the competent International Authorities in connection with the international application identified above, and requests that all correspondence in respect to this application be directed to them at K&L GATES LLP, 3580 Carmel Mountain Road, Suite 200, San Diego, California 92130, U.S.A.:

629

PCT POWER (BI)
Continued...Page 2

Attorney/Agent	U.S. Registration No.
Stephanie L. Seidman	33,779
Frank J. Miskiel	53, 332
Karen G. Potter	57, 254

Address for correspondence:

Stephanie L. Seidman, Esq.
K&L GATES LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130
Telephone: (858) 509-7400
Facsimile: (858) 509-7460
E-mail: stephanie.seidman@klgates.com

BAXTER INTERNATIONAL, INC.

Place:
Deerfield, Illinois, USA

By: _____
Name: James D. Smith
Title: Associate General and Chief IP Counsel

Date: April 14, 2009

630

PATENT COOPERATION TREATY

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

IN RE an international application
based upon the United States
Patent applications identified as:

Applicants: BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.; HALOZYME, INC.

Inventors: Richard SCHIFF; Heinz LEIBL; Gregory I. FROST

International Application entitled:

COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

International Application No.: PCT/US2009/001670
International Filing Date: 16 March 2009

Priority: U.S. Provisional Application No. 61/069,841
Filed: 17 March 2008 (17.03.08)

Our Attorney Docket No.: **0119374-095 (3058PC)**

POWER OF ATTORNEY

Commissioner for Patent
Mail Stop PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

The undersigned applicant hereby revokes all prior appointments of agents or representatives, and appoints the following attorneys and agents as applicant's agent to act on applicant's behalf before the competent International Authorities in connection with the international application identified above, and requests that all correspondence in respect to this application be directed to them at K&L GATES LLP, 3580 Carmel Mountain Road, Suite 200, San Diego, California 92130, U.S.A.:

631

PCT POWER (BH)
Continued...Page 2

Attorney/Agent	U.S. Registration No.
Stephanie L. Seidman	33,779
Frank J. Miskiel	53, 332
Karen G. Potter	57, 254

Address for correspondence:

Stephanie L. Seidman, Esq.
K&L GATES LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130
Telephone: (858) 509-7400
Facsimile: (858) 509-7460
E-mail: stephanie.seidman@klgates.com

BAXTER HEALTHCARE, S.A.

Place:
Deerfield, Illinois, USA

By: _____
Name: James D. Smith
Title: Associate General and Chief IP Counsel

Date: April 14, 2009

632

PATENT COOPERATION TREATY

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

IN RE an international application
based upon the United States
Patent applications identified as:

Applicants: BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.; HALOZYME, INC.

Inventors: Richard SCHIFF; Heinz LEIBL; Gregory I. FROST

International Application entitled:

COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

International Application No.: PCT/US2009/001670
International Filing Date: 16 March 2009

Priority: U.S. Provisional Application No. 61/069,841
Filed: 17 March 2008 (17.03.08)

Our Attorney Docket No.: **0119374-095 (3058PC)**

POWER OF ATTORNEY

Commissioner for Patent
Mail Stop PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

The undersigned applicant hereby revokes all prior appointments of agents or representatives, and appoints the following attorneys and agents as applicant's agent to act on applicant's behalf before the competent International Authorities in connection with the international application identified above, and requests that all correspondence in respect to this application be directed to them at K&L GATES LLP, 3580 Carmel Mountain Road, Suite 200, San Diego, California 92130, U.S.A.:

633

PCT POWER (HALOZYME)
Continued...Page 2

Attorney/Agent	U.S. Registration No.
Stephanie L. Seidman	33,779
Frank J. Miskiel	53, 332
Karen G. Potter	57, 254

Address for correspondence:

Stephanie L. Seidman, Esq.
K&L GATES LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130
Telephone: (858) 509-7400
Facsimile: (858) 509-7460
E-mail: stephanie.seidman@klgates.com

HALOZYME, INC.

Place: San Diego, CA USA

By: _____

Name:

Title: Gregory L. Frost, Ph.D. Vice President & CSO

Date: March 12, 2009

634

PATENT COOPERATION TREATY

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

IN RE an international application
based upon the United States
Patent applications identified as:

Applicants: BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.; HALOZYME, INC.

Inventors: Richard SCHIFF; Heinz LEIBL; Gregory I. FROST

International Application entitled:

COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

International Application No.: PCT/US2009/001670
International Filing Date: 16 March 2009

Priority: U.S. Provisional Application No. 61/069,841
Filed: 17 March 2008 (17.03.08)

Our Attorney Docket No.: **0119374-095 (3058PC)**

POWER OF ATTORNEY

Commissioner for Patent
Mail Stop PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

The undersigned applicant hereby revokes all prior appointments of agents or representatives, and appoints the following attorneys and agents as applicant's agent to act on applicant's behalf before the competent International Authorities in connection with the international application identified above, and requests that all correspondence in respect to this application be directed to them at K&L GATES LLP, 3580 Carmel Mountain Road, Suite 200, San Diego, California 92130, U.S.A.:

635

Attorney/Agent	U.S. Registration No.
Stephanie L. Seidman	33,779
Frank J. Miskiel	53, 332
Karen G. Potter	57, 254

Address for correspondence:

Stephanie L. Seidman, Esq.
K&L GATES LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130
Telephone: (858) 509-7400
Facsimile: (858) 509-7460
E-mail: stephanie.seidman@klgates.com

(1)
Place: Westlake Village CA USA

RICHARD SCHIFF

Signature

Date: 12 MAR 2009

(2)
Place:

_____

HEINZ LEIBL

_____
Signature

Date:_____

(3)
Place:

_____

GREGORY I. FROST

_____
Signature

Date:_____

636

PATENT COOPERATION TREATY

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

IN RE an international application
based upon the United States
Patent applications identified as:

Applicants: BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.; HALOZYME, INC.

Inventors: Richard SCHIFF; Heinz LEIBL; Gregory I. FROST

International Application entitled:

COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

International Application No.: PCT/US2009/001670
International Filing Date: 16 March 2009

Priority: U.S. Provisional Application No. 61/069,841
Filed: 17 March 2008 (17.03.08)

Our Attorney Docket No.: **0119374-095 (3058PC)**

POWER OF ATTORNEY

Commissioner for Patent
Mail Stop PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

The undersigned applicant hereby revokes all prior appointments of agents or representatives, and appoints the following attorneys and agents as applicant's agent to act on applicant's behalf before the competent International Authorities in connection with the international application identified above, and requests that all correspondence in respect to this application be directed to them at K&L GATES LLP, 3580 Carmel Mountain Road, Suite 200, San Diego, California 92130, U.S.A.:

639

PCT POWER (INVENTORS)
Continued...Page 2

Attorney/Agent	U.S. Registration No.
Stephanie L. Seidman	33,779
Frank J. Miskiel	53, 332
Karen G. Potter	57, 254

Address for correspondence:

Stephanie L. Seidman, Esq.
K&L GATES LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130
Telephone: (858) 509-7400
Facsimile: (858) 509-7460
E-mail: stephanie.seidman@klgates.com

(1)
Place:

_____

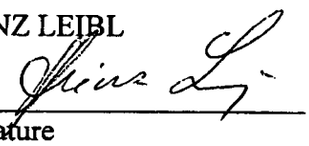
RICHARD SCHIFF

_____
Signature

Date:_____

(2)
Place:
Vienna

HEINZ LEIBL


Signature

Date: March 25, 2009

(3)
Place:

_____

GREGORY I. FROST

_____
Signature

Date:_____

638

PATENT COOPERATION TREATY

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

IN RE an international application
based upon the United States
Patent applications identified as:

Applicants: BAXTER HEALTHCARE, S.A.; BAXTER INTERNATIONAL, INC.; HALOZYME, INC.

Inventors: Richard SCHIFF; Heinz LEIBL; Gregory I. FROST

International Application entitled:

COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

International Application No.: PCT/US2009/001670
International Filing Date: 16 March 2009

Priority: U.S. Provisional Application No. 61/069,841
Filed: 17 March 2008 (17.03.08)

Our Attorney Docket No.: **0119374-095 (3058PC)**

POWER OF ATTORNEY

Commissioner for Patent
Mail Stop PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

The undersigned applicant hereby revokes all prior appointments of agents or representatives, and appoints the following attorneys and agents as applicant's agent to act on applicant's behalf before the competent International Authorities in connection with the international application identified above, and requests that all correspondence in respect to this application be directed to them at K&L GATES LLP, 3580 Carmel Mountain Road, Suite 200, San Diego, California 92130, U.S.A.:

639

PCT POWER (INVENTORS)
Continued...Page 2

Attorney/Agent	U.S. Registration No.
Stephanie L. Seidman	33,779
Frank J. Miskiel	53, 332
Karen G. Potter	57, 254

Address for correspondence:

Stephanie L. Seidman, Esq.
K&L GATES LLP
3580 Carmel Mountain Road, Suite 200
San Diego, California 92130
Telephone: (858) 509-7400
Facsimile: (858) 509-7460
E-mail: stephanie.seidman@klgates.com

(1) RICHARD SCHIFF
Place: _____
Signature
Date: _____

(2) HEINZ LEIBL
Place: _____
Signature
Date: _____

(3) GREGORY I. FROST
Place: San Diego, CA USA
Signature
Date: March 12, 2009

640

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111104- -00000-0000
Fecha: 2010-09-08 14:56:38 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 640

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art.33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT .
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud .
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐